

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
Für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

**Herstellung und immunfluoreszenzmikroskopische
Anwendung monoklonaler Maus-Antikörper gegen
sezernierte Proteine von *Staphylococcus aureus* (SERAMs)**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Josef Veit
aus Hutthurm

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Daniel Teupser
Prof. Dr. Uwe Heemann
Prof. Dr. Johannes Hübner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christoph Guggenberger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> : Mikrobiologische Einordnung	1
1.2 Pathogenität und klinische Relevanz von <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3 Nosokomial erworbene MRSA (HA-MRSA)	4
1.4 Gemeinschafts-assoziierte MRSA (CA-MRSA)	6
1.5 Virulenz-assoziierte Faktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.5.1 Toxine und Toxin-vermittelte Erkrankungen	8
1.5.2 Mechanismen der Immunevasion	9
1.5.3 Sekretom und Sekretionssysteme von <i>S. aureus</i>	10
1.5.4 MSCRAMMs	11
1.5.5 SERAMs	12
1.6 Pathogenese der Abszessbildung.....	23
1.7 <i>Staphylococcus aureus</i> : Analyse in einer 3D-Kollagenmatrix (3D-CoG)	24
1.8 Therapeutische Strategien bei <i>S. aureus</i> -Infektionen.....	25
1.8.1 Antibiotika	26
1.8.2 Aktive Immunisierung gegen <i>S. aureus</i>	27
1.8.3 Anti-Virulenz-Strategie	29
1.9 Monoklonale Antikörper gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.10 Ziele der Arbeit	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Verbrauchsmaterialien	34
2.2 Chemikalien, Biochemikalien und Medien	35
2.3 Puffer und Lösungen	37
2.4 Medien.....	38
2.4.1 Medien für die Zellkultur	38
2.4.2 Medien für die Kultur von Bakterien	38
2.5 Verwendete Bakterienstämme	39
2.6 Zelllinien.....	41

INHALTSVERZEICHNIS

2.7	Mauslinien	41
2.8	Antibiotika	41
2.9	Enzyme	41
2.10	Oligonukleotide	41
2.11	Plasmide	42
2.12	Antikörper	43
2.12.1	Primäre Antikörper	43
2.12.2	Sekundäre Antikörper	43
2.13	Molekularbiologische Fertigprodukte (Kits)	43
2.14	Geräte und Software	44
2.15	Mikrobiologische Methoden	46
2.15.1	Kultivierung in Flüssigmedien	46
2.15.2	Kultivierung auf Festmedien	46
2.16	Proteinbiochemische Methoden	47
2.16.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.16.2	Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969)	48
2.16.3	Western Blot	49
2.16.4	TCA-Fällung von Kulturüberstandsproteinen	51
2.16.5	Extraktion zellwandassoziiierter Proteine von <i>S. aureus</i>	52
2.16.6	Proteinmengenbestimmung	52
2.17	Molekulargenetische und analytische Methoden	52
2.17.1	Aufreinigung chromosomaler DNA (<i>S. aureus</i>)	52
2.17.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.17.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	54
2.17.4	Agarose-Gelelektrophorese	54
2.17.5	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	54
2.17.6	Klonierung von PCR-Fragmenten in die Vektoren pCR®2.1TOPO und pSC-A- amp/kan	57
2.17.7	Plasmidpräparation	59
2.17.8	Restriktionsverdau von Vektoren und PCR-Produkten	59
2.17.9	Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pET-28a	61
2.17.10	DNA-Konzentrationsbestimmung	62
2.17.11	DNA-Sequenzierung	62
2.17.12	MALDI-TOF	62
2.18	Zellbiologische Methoden	62
2.18.1	Kultivierung von Hybridomazellen	62

INHALTSVERZEICHNIS

2.18.2 Einfrieren von Hybridomazellklonen	63
2.18.3 Auftauen von Hybridomazellen.....	63
2.19 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	63
2.19.1 Produktionsanalyse.....	64
2.19.2 Löslichkeitstest.....	64
2.19.3 Induktion.....	65
2.19.4 Aufschluss der Zellen und Aufreinigung der produzierten Proteine.....	65
2.19.5 Dialyse der aufgereinigten Proteine.....	66
2.20 Herstellung monoklonaler Antikörper	66
2.20.1 Immunisierung der BALB/c-Mäuse.....	67
2.20.2 Fusion	67
2.20.3 Testen der Hybridomazell-Überstände auf spezifische Antikörper.....	69
2.20.4 Klonierung positiver Hybridoma-Klone	70
2.20.5 Isotypisierung der Antikörper	71
2.21 Analyse und Färbung von Staphylokokken im 3D-Kollagengel (3D-CoG)	71
2.21.1 Herstellung der 3D-Kollagengele (3D-CoG/FP)	72
2.21.2 Färbung der 3D-Kollagengele (3D-CoG/FP).....	73
2.21.3 <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	73
3 Ergebnisse.....	74
3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Kulturüberstandsproteine (SERAMs) von <i>Staphylococcus aureus</i>	74
3.1.1 Herstellung der Antigene	74
3.1.2 Ergebnisse des <i>Screenings</i>	75
3.1.3 Klonierung positiver Klone	76
3.1.4 Monoklonaler Antikörper A198F3 (α -IsaA)	80
3.1.5 Monoklonaler Antikörper A97D6 (α -Glycerolesterhydrolase)	81
3.1.6 Weitere monoklonale Antikörper	82
3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen rekombinante SERAMs (Coa, vWbp, Efb)	82
3.2.1 Herstellung rekombinanter Proteine (Coa, vWbp, Emp, Efb, Eap).....	82
3.2.2 Vorbereitung der rekombinanten Antigene für die Immunisierungen von BALB/c-Mäusen	99
3.2.3 Immunisierung mit rekombinantem vWbp.....	99
3.2.4 Immunisierung mit rekombinantem Coa, vWbp und Efb	101
3.2.5 2. Immunisierung mit rekombinantem vWbp	108

INHALTSVERZEICHNIS

3.3 Nachweis der SERAMs Coa, vWbp, Emp und Efb mittels monoklonaler Antikörper bei klinischen MSSA- und MRSA-Isolaten	111
3.3.1 Immunoblots zum Nachweis von Coa mit mAk C231D3 (α -Coa).....	112
3.3.2 Immunoblots zum Nachweis von vWbp mit mAk D35B11 (α -vWbp)	117
3.3.3 Immunoblots zum Nachweis von Emp mit mAk A214C9 (α -Emp)	122
3.3.4 Immunoblots zum Nachweis von Efb mit mAk C202H7 (α -Efb)	127
3.4 Immunfluoreszenzmikroskopische (IFM) Anwendung der monoklonalen Antikörper im 3D-Kollagengel.....	132
3.4.1 Analyse des Wachstums im 3D-CoG/FP	133
3.4.2 IFM-Anwendung von mAk A214C9 (α -Emp)	136
3.4.3 IFM-Anwendung von mAk C202H7 (α -Efb)	146
3.5 Tabellarische Übersicht der Immundetektionsergebnisse mit den monoklonalen Antikörpern (α-Coa, α-vWbp, α-Emp und α-Efb) für diverse <i>S. aureus</i>-Stämme	153
4 Diskussion.....	157
4.1 Generierung muriner monoklonaler Antikörper gegen SERAMs von <i>Staphylococcus aureus</i> Newman	158
4.1.1 Auswahl und Herstellung der Antigene für die Immunisierung.....	159
4.1.2 Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung	161
4.1.3 Anwendung der monoklonalen Antikörper zur Pathotypisierung klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate.....	168
5 Zusammenfassung.....	180
6 Literaturverzeichnis.....	182
7 Anhang	204
Danksagung.....	204
Eidesstattliche Versicherung	205

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	°Celsius
3D-CoG	Dreidimensionales Kollagengel
3D-CoG/F	Dreidimensionales Kollagengel (mit Fibrinogen supplementiert)
3D-CoG/FP	Dreidimensionales Kollagengel (mit Fibrinogen und Prothrombin supplementiert)
A	Adenin
ad	addiere/auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Coa	Koagulase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Efb	Extrazelluläres Fibrinogen-Bindeprotein
ELISA	<i><u>E</u>nzyme-<u>l</u>inked <u>I</u>mmunosorbent <u>A</u>ssay</i>
Emp	Extrazelluläres Matrix-Bindeprotein
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HA	Hypoxanthin-Azaserin
His	Histidin
HRP	<i><u>H</u>orseradish <u>P</u>eroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IsaA	<i><u>I</u>mmunodominant <u>s</u>urface <u>a</u>ntigen <u>A</u></i>
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	<i><u>L</u>ysogeny <u>B</u>roth</i>
Lip	Glycerolesterhydrolase/Lipase
log	logarithmisch
M	Molar
mA	milli-Ampère
MALDI-TOF	<i><u>M</u>atrix-<u>A</u>ssisted-<u>L</u>aser-<u>D</u>esorption-<u>I</u>onisation <u>T</u>ime-<u>O</u>f-<u>F</u>light</i>
MAM	<i><u>M</u>icrocolony-<u>a</u>ssociated <u>M</u>eshwork</i>
MCS	<i><u>M</u>ultiple <u>C</u>loning <u>S</u>ite</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	milli-Molar

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mm	Millimeter
Mops	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Mrd.	Milliarden
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	<u>M</u> icrobial <u>S</u> urface <u>C</u> omponents <u>R</u> ecognizing <u>A</u> dhesive <u>M</u> atrix <u>M</u> olecules
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	<u>P</u> seudocapsule (Pseudokapsel)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
pmol	Pikomol
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	<u>S</u> mall <u>C</u> olony <u>V</u> ariants
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERAMs	<u>S</u> ecretable <u>E</u> xpanded <u>R</u> epertoire <u>A</u> dhesive <u>M</u> olecules
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS-T	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline mit 0,1 % (v/v) „Tween 20“
TCA	Trichloressigsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
U	Uridin
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
vWbp	von Willebrand-Faktor-Bindeprotein
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Zellhülle von <i>Staphylococcus aureus</i> (vereinfacht).....	3
Abbildung 1.2: Gerinnungskaskade mit pathologischer Aktivierung durch Coa und vWbp	16
Abbildung 1.3: Komplementsystem in Interaktion mit den SERAMs Efb und Eap	21
Abbildung 1.4: <i>S. aureus</i> -Mikrokolonie im 3D-CoG/F mit Pseudokapsel und MAM.....	25
Abbildung 3.1: Spektrum sezernierter Kulturüberstandsproteine des Stammes <i>Staphylococcus aureus</i> Newman (SDS-PAGE)	75
Abbildung 3.2: <i>Western Blot</i> TCA-gefällter <i>S. aureus</i> -Kulturüberstandsproteine (Ponceau S- gefärbt)	76
Abbildung 3.3: mAk A214C9 (α -Emp- <i>Immunoblot</i>)	78
Abbildung 3.4: Detektionsgrenze von mAk A214C9 (α -Emp- <i>Immunoblot</i>) (A) und SDS-PAGE (B)	79
Abbildung 3.5: Isotypisierung von mAk A214C9 (α -Emp).....	79
Abbildung 3.6: mAk A198F3: α -IsaA- <i>Immunoblot</i> und SDS-PAGE.....	80
Abbildung 3.7: mAk A97D6: α -Lip- <i>Immunoblot</i> und SDS-PAGE	81
Abbildung 3.8: Darstellung der PCR- <i>Primer</i> und Amplifikation von <i>coa</i>	84
Abbildung 3.9: Produktionsanalyse von Coa (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE).....	85
Abbildung 3.10: Aufreinigung der rekombinanten Coa (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen).....	85
Abbildung 3.11: Darstellung der PCR- <i>Primer</i> und Amplifikation von <i>vwbp</i>	87
Abbildung 3.12: Produktionsanalyse des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS- PAGE)	88
Abbildung 3.13: Löslichkeitstest des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)....	89
Abbildung 3.14: Aufreinigung des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen).....	90
Abbildung 3.15: α -(His) ₆ -vWbp- <i>Immunoblot</i>	91
Abbildung 3.16: Darstellung der PCR- <i>Primer</i> und Amplifikation von <i>emp</i>	92
Abbildung 3.17: Produktionsanalyse von Emp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE).....	93
Abbildung 3.18: Säulenchromatographische Aufreinigung von Emp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen).....	93
Abbildung 3.19: Darstellung der PCR- <i>Primer</i> und Amplifikation von <i>efb</i>	95
Abbildung 3.20: Produktionsanalyse des rekombinanten Efb (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE) 96	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.21: Säulenchromatographische Aufreinigung des rekombinanten Efb (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)	96
Abbildung 3.22: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation des <i>eap</i> -Gens.....	98
Abbildung 3.23: Säulenchromatographische Aufreinigung des rekombinanten Eap (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)	99
Abbildung 3.24: Aufgereinigtes vWbp nach Dialyse (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)	100
Abbildung 3.25 mAk B194 im <i>Immunoblot</i>	101
Abbildung 3.26: mAk C231D3 (α -Coa- <i>Immunoblot</i>)	103
Abbildung 3.27: Detektionsgrenze von mAk C231D3 (α -Coa- <i>Immunoblot</i>) (A) und SDS-PAGE (B)	104
Abbildung 3.28: Isotypisierung von mAk C231D3 (α -Coa).....	104
Abbildung 3.29: mAk C202H7 (α -Efb- <i>Immunoblot</i>).....	106
Abbildung 3.30: Detektionsgrenze von mAk C202H7 (α -Efb- <i>Immunoblot</i>) (A) und SDS-PAGE (B)	107
Abbildung 3.31: Isotypisierung von mAk C202H7 (α -Efb)	107
Abbildung 3.32: mAk D35B11 (α -vWbp- <i>Immunoblot</i>)	109
Abbildung 3.33: Detektionsgrenze von mAk D35B11 (α -vWbp- <i>Immunoblot</i>) (A) und SDS- PAGE (B).....	110
Abbildung 3.34: Isotypisierung von mAk D35B11 (α -vWbp)	110
Abbildung 3.35: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Coa im RPMI-Kulturüberstand klinischer <i>S.</i> <i>aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).....	113
Abbildung 3.36: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Coa im Zellsediment klinischer <i>S. aureus</i> - Isolate in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).	114
Abbildung 3.37: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Coa im RPMI-Kulturüberstand der MRSA- Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in exponentiellen (A) und stationären Phase (B).....	115
Abbildung 3.38: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Coa im Zellsediment der MRSA- Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).....	116
Abbildung 3.39: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von vWbp im RPMI-Kulturüberstand klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.	118
Abbildung 3.40: : <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von vWbp im Zellsediment klinischer <i>S.</i> <i>aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.41: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von vWbp im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	120
Abbildung 3.42: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von vWbp im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	121
Abbildung 3.43: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Emp im RPMI-Kulturüberstand klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	123
Abbildung 3.44: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Emp im Zellsediment klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.	124
Abbildung 3.45: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Emp im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	125
Abbildung 3.46: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Emp im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	126
Abbildung 3.47: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Efb im RPMI-Kulturüberstand klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) stationären (B) Phase.....	128
Abbildung 3.48: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Efb im Zellsediment klinischer <i>S. aureus</i> -Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase	129
Abbildung 3.49: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Efb im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP5, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	130
Abbildung 3.50: <i>Immunoblots</i> zum Nachweis von Efb im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP5, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.....	131
Abbildung 3.51: <i>S. aureus</i> Newman-Mikrokolonie im 3D-CoG/FP	134
Abbildung 3.52: <i>S. aureus</i> Newman-Mikrokolonie im 3D-CoG	134
Abbildung 3.53: MRSA und MSSA-Sputumisolate (SP) im 3D-CoG/FP	135
Abbildung 3.54: MRSA- und MSSA-Blutkulturisolate im 3D-CoG/FP	135
Abbildung 3.55: MRSA- und MSSA-Wundisolate im 3D-CoG/FP	136
Abbildung 3.56: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in <i>S. aureus</i> Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	137
Abbildung 3.57: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des α -Maus IgG Cy3-Hintergrundsignals in <i>S. aureus</i> Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP (Negativkontrolle)	138

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.58: Immunfloreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in den Mutanten Newman <i>coa</i> und Newman <i>vwbp emp</i> im 3D-CoG/FP	139
Abbildung 3.59: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA SP1- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	140
Abbildung 3.60: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA SP2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	140
Abbildung 3.61: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA SP1/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	141
Abbildung 3.62: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA SP2/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	141
Abbildung 3.63: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA BK1- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	142
Abbildung 3.64: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA BK2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	142
Abbildung 3.65: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA BK3/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	143
Abbildung 3.66: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA BK4/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	143
Abbildung 3.67: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA WU1- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	144
Abbildung 3.68: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA WU2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	144
Abbildung 3.69: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA WU1/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	145
Abbildung 3.70: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA WU2/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	145
Abbildung 3.71: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in <i>S. aureus</i> Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	146
Abbildung 3.72: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA SP1- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	147
Abbildung 3.73: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA SP2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	147
Abbildung 3.74: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA SP1/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	148
Abbildung 3.75: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA SP2/2- Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	148

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.76: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA BK1-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	149
Abbildung 3.77: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA BK2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	149
Abbildung 3.78: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA BK3/2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	150
Abbildung 3.79: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA BK4/2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	150
Abbildung 3.80: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA WU1-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	151
Abbildung 3.81: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA WU2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	151
Abbildung 3.82: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA WU1/2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	152
Abbildung 3.83: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA WU2/2-	
Mikrokolonien im 3D-CoG/FP	152

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht zu MSCRAMMs (Tabelle modifiziert nach Foster <i>et al.</i> , 2014)	12
Tabelle 1.2: Übersicht zu wichtigen SERAMs (nach Chavakis <i>et al.</i> , 2005)	13
Tabelle 2.1: Verwendete MSSA-Stämme.....	39
Tabelle 2.2: Verwendete MRSA-Referenzstämme (NRZ Wernigerode)	39
Tabelle 2.3: Weitere verwendete klinische MRSA-Stämme	40
Tabelle 2.4: Verwendete klinische MSSA-Stämme	40
Tabelle 2.5: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	40
Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinie	41
Tabelle 2.7: Verwendete Enzyme	41
Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide.....	42
Tabelle 2.9: Verwendete Plasmide	42
Tabelle 2.10: Verwendete sekundäre Antikörper	43
Tabelle 2.11: Verwendete Molekularbiologische <i>Kits</i>	43
Tabelle 2.12: Verwendete Geräte.....	44
Tabelle 2.13: Verwendete Software.....	46
Tabelle 2.14: SDS-Polyacrylamid-Gele (Trenngele)	48
Tabelle 2.15: Sammelgel (5 %)	48
Tabelle 2.16: PCR-Reaktionsprogramm.....	53
Tabelle 2.17: PCR-Reaktionsansätze (50 µl).....	53
Tabelle 2.18: <i>Screening</i> -PCR (25 µl)	54
Tabelle 3.1: Induktionsbedingungen im Löslichkeitstest von vWbp	89
Tabelle 3.2: Übersicht zum Nachweis von Coa im <i>Immunoblot</i> mittels mAk C231D3 (α -Coa) ..	153
Tabelle 3.3: Übersicht zum Nachweis von vWbp im <i>Immunoblot</i> mittels mAk D35B11 (α - vWbp).....	154
Tabelle 3.4: Übersicht zum Nachweis von Emp im <i>Immunoblot</i> und in Mikrokolonien im 3D- CoG/FP mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (mAk A214C9, α -Emp)	155
Tabelle 3.5 Übersicht zum Nachweis von <i>S. aureus</i> Efb im <i>Immunoblot</i> und in Mikrokolonien im 3D-CoG/FP mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (mAk C202H7, α -Efb).....	156

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*: Mikrobiologische Einordnung

Auf der Liste der Schwerpunktthemen des G7-Gipfels 2015 stand neben zentralen Fragen der Außen-, Sicherheits-, und Entwicklungspolitik auch die Herausforderung durch antibiotikaresistente Keime (Bundesregierung, 2016). Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA) reihen sich in eine lange Liste unzähliger Keime, die bedingt durch ihre zunehmende Verbreitung eine Bedeutung globalen Ausmaßes erlangt haben. Forschung und Wissenschaft begegnen dieser Herausforderung in Form zahlloser Projekte, um Mechanismen der Pathogenese und Resistenzentwicklung aufzuklären und innovative präventive und therapeutische Perspektiven zu eröffnen.

Staphylokokken sind weit verbreitete, grampositive, nicht-sporenbildende, unbewegliche, ca. 1 µm große, kugelförmige Bakterien, die sich unter lichtmikroskopischer Betrachtung als traubenartig angeordnete Haufenkokken präsentieren (Paniker *et al.*, 2005). Aktuell umfasst das Genus *Staphylococcus* 47 Spezies und 23 Subspezies, wobei *S. aureus* als Koagulase-positive Art von besonderer medizinischer Bedeutung ist (Becker *et al.*, 2014). Umhüllt sind Staphylokokken von einer Zytoplasmamembran, der sich außen eine 30 – 100 nm dicke Peptidoglykan-Schicht anschließt (Silhavy *et al.*, 2010). Biochemisch handelt es sich bei dieser auch Murein-Sacculus genannten Zellwand um eine mehrlagige Schicht aus Glykan-Strängen (N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin, alternierend β-1,4-glykosidisch verbunden), die durch kurze Peptidketten quervernetzt sind (Vollmer *et al.*, 2008). In Abbildung 1.1 findet sich eine schematische Übersicht der Zellwand von *S. aureus* samt assoziierter Strukturen.

Staphylococcus aureus besiedelt als Kommensale und opportunistischer Erreger häufig die menschliche Haut und Schleimhäute insbesondere des Nasenvorhofs, ohne infektionsbedingte Symptome hervorzurufen (Kluytmans *et al.*, 1997). 20 % der Menschen sind dauerhaft mit Staphylokokken besiedelt, während sich beim größten Teil die Keime nur intermittierend oder überhaupt nicht nachweisen lassen (Kluytmans *et al.*, 1997, van Belkum *et al.*, 2009). Ein Grund für die weite Verbreitung von Staphylokokken liegt in ihrer ausgeprägten Tenazität begründet (RKI, 2009). Gegenüber

ungünstigen Umweltbedingungen wie z. B. längeren Trockenphasen weisen Staphylokokken eine weitgehende Resistenz auf (Chaibenjawong und Foster, 2011). *S. aureus* wächst in einem breiten Temperaturbereich von 10 – 42 °C mit einem Optimum bei 37 °C und einem pH von 7,4 – 7,6 (Paniker *et al.*, 2005). Er übersteht Temperaturen von 60 °C für bis zu 30 min (Paniker *et al.*, 2005). Viele Stämme wachsen noch bei NaCl-Konzentrationen bis zu 15 % und können noch nach 2 – 3 Monaten aus getrocknetem Eiter isoliert werden (Paniker *et al.*, 2005). Auf trockenen, unbelebten Oberflächen können *S. aureus*-Stämme bis zu 7 Monate überleben (Neely und Maley, 2000, Kramer *et al.*, 2006). Die unbelebte Umwelt stellt deshalb nicht nur im klinischen Umfeld ein bedeutendes Reservoir für die Übertragung von Staphylokokken auf den Menschen dar. *S. aureus* gilt als opportunistischer bzw. fakultativ pathogener Erreger. Trifft er beim Wirt auf eine geschwächte immunologische Abwehr, so ist eine weitgehende Entfaltung seines pathogenen Potentials möglich (Tong *et al.*, 2015). Gemessen an der pathogenen Potenz und der Schwere der durch ihn ausgelösten Infektionen behauptet sich *Staphylococcus aureus* als unangefochtener Spitzenreiter unter den zahlreichen Vertretern seiner Spezies (RKI, 2009).

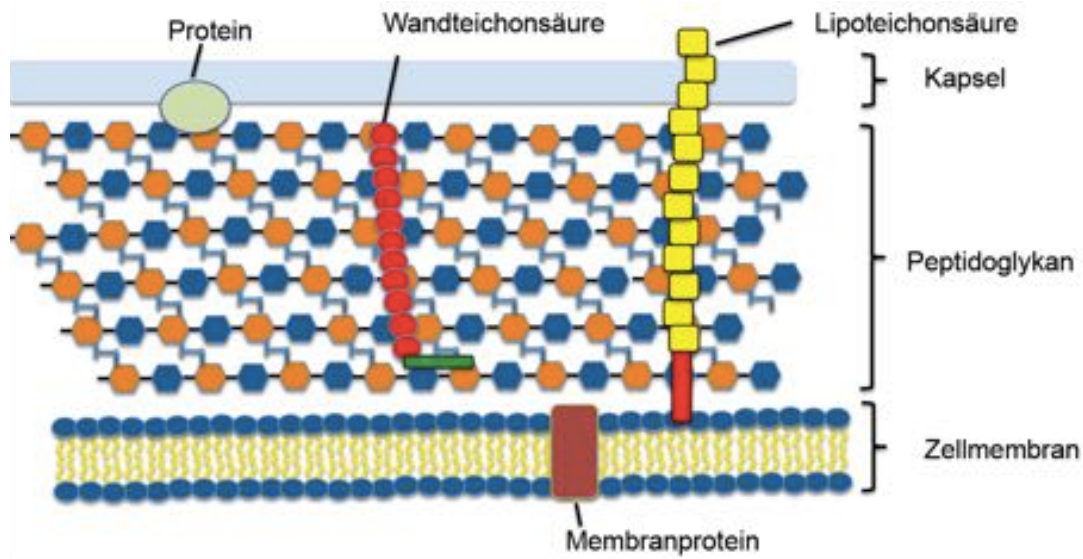


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Zellhülle von *Staphylococcus aureus* (vereinfacht)

Die Hülle von *S. aureus* besteht aus einer Zytoplasmamembran (Lipiddoppelschicht) und einer dicken, mehrlagigen Peptidoglykanschicht (Zellwand). Kapsuläre Polysaccharide bilden die äußerste Schicht. Zahlreiche assoziierte Zellwandkomponenten modifizieren diese Grundstruktur und machen die Zellhülle dadurch zu einem multifunktionalen und komplexen System. Wichtige Bestandteile der Zellhülle sind die Teichonsäuren. Lipoteichonsäuren sind in der Zellmembran verankert, während die Wandteichonsäuren kovalent mit der Peptidoglykanschicht verbunden sind. Sie vermitteln als anionische Polymere eine Vielzahl von Funktionen von der Kationenhomöostase bis hin zur Zellteilung. Zellwandassoziierte Proteine weisen in Art und Funktion eine große Vielfalt auf und werden in den Abschnitten 1.5.3, 1.5.4 und 1.5.5 genauer dargestellt. Grafik und Beschreibung sind modifiziert nach den Übersichtsartikeln von Silhavy et al. (2010) und Schneewind und Missiakas (2012) dargestellt. (Silhavy et al., 2010, Schneewind und Missiakas, 2012)

1.2 Pathogenität und klinische Relevanz von *Staphylococcus aureus*

Seit Alexander Ogston im Jahr 1881 die Ursache von purulenten chirurgischen Wunden in von ihm mikroskopisch erkannten „Mikrokokken“ identifizierte (Ogston, 1881), ist *Staphylococcus aureus* heute zu einer zentralen Herausforderung im klinischen Alltag gewachsen. Die häufigste Manifestationsform *S. aureus*-bedingter Erkrankungen stellen oberflächliche, lokal begrenzte Infektionen von Haut und Weichgeweben dar (Becker und Bubeck Wardenburg, 2015). Dazu zählen Furunkel, Karbunkel und Weichteilabszesse (RKI, 2009). Ausgehend von diesen Herden kann eine Invasion und Dissemination der Keime erfolgen und zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern wie der infektiösen Endokarditis (Fowler et al., 2005), Osteomyelitis (Carragee, 1997) sowie

Pneumonie (Rubinstein *et al.*, 2008) führen. Systemische Erkrankungen wie die grampositive Sepsis, das Toxische Schock-Syndrom (DeVries *et al.*, 2011) und das *Staphylococcal scalded skin syndrome* (Ladhani, 2003) präsentieren sich häufig in Form fulminanter Verläufe.

Auch wenn in den letzten Jahren ein konstanter Rückgang der im Krankenhaus erworbenen MRSA-Infektionen verzeichnet werden konnte (RKI, 2013, RKI, 2015), stellt das epidemische Auftreten multiresistenter *S. aureus*-Stämme (MRSA) die Therapie infektiöser Staphylokokken-Erkrankungen vor gravierende Probleme (Hiramatsu *et al.*, 2001). Auch eine primär asymptomatische Trägerschaft von *Staphylococcus aureus* geht mit einem erhöhten Risiko für Staphylokokken-bedingte Infektionserkrankungen einher (Williams *et al.*, 1959, Wenzel und Perl, 1995, Wertheim *et al.*, 2005). In einer Bakteriämie-Studie stimmten Blutkulturisolate in über 80 % der Fälle mit den jeweils nasal isolierten Stämmen überein (von Eiff *et al.*, 2001). Eine Eradikation mit Mupirocin hat deshalb eine protektive Wirkung und führt zu einer Reduktion nosokomialer Infektionsraten (Perl *et al.*, 2002). Chronisch-rezidivierende Verläufe Staphylokokken-bedingter Infektionserkrankungen können zum Teil durch *Persister*-Zellen erklärt werden, die u. a. bedingt durch eine niedrige Stoffwechselaktivität eine hohe Toleranz gegenüber einer antibiotischen Therapie aufweisen (Conlon, 2014). Zu den prädisponierenden Faktoren für chronische *S. aureus*-Infektionen wie der rezidivierenden Furunkulose zählen u. a. positive Familienanamnese, Anämie, Diabetes mellitus, vorausgehende antibiotische Therapie und Krankenhausaufenthalte (El-Gilany und Fathy, 2009).

1.3 Nosokomial erworbene MRSA (HA-MRSA)

Die Geschichte der antimikrobiellen Therapie gleicht einem strategischen Wettrüsten mit *S. aureus*. Meilensteine in der Entwicklung der Antibiotika werden dabei von sich rasch ausbreitenden Resistenzen überschattet. Nach der Einführung von Penicillin im Jahr 1941 wich die Begeisterung aufgrund seiner anfänglich sensationellen therapeutischen Erfolge schnell einer breiten Ernüchterung. Die Rate an unempfindlichen *S. aureus*-Isolaten in einem Krankenhaus lag schon 1946 bei 14,1 % und stieg innerhalb von zwei Jahren auf 59 % im Jahr 1948 (Barber und Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Die Penicillin-Resistenz wird durch Enzyme (β -Lactamasen) vermittelt, die den β -Lactam-Ring des Antibiotikums spalten und damit dessen Wirkung

aufheben (Dyke *et al.*, 1966). Auch gegen Methicillin, dem ersten β -Lactamase-festen Antibiotikum, wurden bereits wenige Jahre nach dessen Einführung Resistenzen beschrieben (Barber, 1961, Rolinson, 1961). *S. aureus*-Stämme, die gegen β -Lactamase-resistente Antibiotika wie Methicillin, Oxacillin oder Flucloxacillin unempfindlich sind, werden als Methicillin- bzw. Oxacillin-resistente *S. aureus* (MRSA/ORSA) bezeichnet, empfindliche Stämme dagegen als Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) (RKI, 2014). Treten sie Krankenhaus-assoziiert auf, spricht man aus epidemiologischer Sicht von nosokomialen oder *hospital-acquired* MRSA (HA-MRSA) im Vergleich zu ambulant-erworbenen oder *community-acquired* MRSA (CA-MRSA). Deren Resistenz wird durch ein zusätzliches Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) vermittelt, das eine niedrige Affinität zu Methicillin aufweist (Hartman und Tomasz, 1984) und durch das Gen *mecA* kodiert wird (Matsushashi *et al.*, 1986, Ubukata *et al.*, 1989, Katayama *et al.*, 2000). Penicillin-Bindeproteine sind Enzyme, die an entscheidenden Schritten der Zellwandsynthese beteiligt sind und den Angriffspunkt von β -Lactamantibiotika darstellen (Peacock und Paterson, 2015).

Obwohl sich Infektionen durch MSSA und MRSA klinisch nicht voneinander unterscheiden lassen (RKI, 2014), wird die Frage, ob Methicillin-resistente Isolate mit einer höheren Virulenz assoziiert sind seit Jahren intensiv diskutiert (Rozgonyi *et al.*, 2007). Viele Studien weisen darauf hin, dass MRSA-Infektionen mit einer höheren Mortalität einhergehen. In der von Cosgrove *et al.* durchgeführten Metaanalyse zeigte sich, dass MRSA-Bakteriämien im Vergleich MSSA-Bakteriämien mit einer signifikant höheren Mortalität assoziiert sind (OR: 1.93; 95% CI: 1.54–2.42; $P < .001$) (Cosgrove *et al.*, 2003). Unklar ist jedoch nach wie vor, welche Faktoren für diese Unterschiede verantwortlich sind. Yaw *et al.* konnten in einer observativen Kohortenstudie zwar eine Assoziation zwischen MRSA-Bakteriämie und einer erhöhten Langzeitmortalität feststellen. Nach Adjustierung für prognostisch relevante Störfaktoren (u. a. Alter, Komorbiditäten, Schwere der Erkrankung) waren jedoch statistisch signifikante Unterschiede nicht mehr nachweisbar (Yaw *et al.*, 2014). Demnach könnte die MRSA-assoziierte Mortalität ein Surrogatparameter für bestimmte Wirtsfaktoren sein (van Hal *et al.*, 2012, Yaw *et al.*, 2014). Van Hal *et al.* (2012) führen in ihrem Übersichtsartikel weitere Diskussionspunkte an: Patienten mit MRSA-Bakteriämie haben eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, während der ersten 48 Stunden der Hospitalisation im Vergleich zu Patienten mit MSSA-Bakteriämie eine nicht-wirksame antibiotische

Therapie zu erhalten (Roghmann, 2000). Ein Teil der Unterschiede könnte auch auf den SCCmec-Typ zurückzuführen sein (Ganga *et al.*, 2009). Darüber hinaus werden von van Hal *et al.* pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften von Vancomycin also mögliche Teilursachen thematisiert. Rozgonyi *et al.* weisen darauf hin, dass die zum Teil widersprüchlichen Studienergebnisse in dieser Frage auf der Heterogenität der untersuchten MRSA-Populationen beruhen könnten und deshalb weitere vergleichende Untersuchungen mit isogenen MRSA- und MSSA-Subpopulationen durchgeführt werden müssten (Rozgonyi *et al.*, 2007).

Im Jahr 2014 waren nach dem nationalen Überwachungssystem für Antibiotika-Resistenzen (ARS: Antibiotika Resistenz Surveillance, <https://ars.rki.de>) im stationären Bereich 75,7 % der *S. aureus*-Isolate Penicillin-resistent, 17,6 % der untersuchten Isolate zeigten sich unempfindlich gegen Oxacillin (RKI, 2015).

Die durch MRSA hervorgerufene ökonomische Belastung ist enorm. Allein die dadurch im Krankenhaus verursachten Kosten betrugen in Deutschland im Jahr 2011 zwischen 354,29 Mio. € und 1,55 Mrd. € (Claus *et al.*, 2014).

1.4 Gemeinschafts-assoziierte MRSA (CA-MRSA)

Neben nosokomial erworbenen Staphylokokken stellen ambulant-erworbene (*community-acquired*) MRSA (CA-MRSA) eine relativ neue Entität dar, die erstmals 1993 in Australien beschreiben wurde (Udo *et al.*, 1993, O'Brien *et al.*, 2004). Sie werden unabhängig von Krankenhausaufenthalten in der Gemeinschaft erworben und können aufgrund ihrer höheren Virulenz im Vergleich zu nosokomial erworbenen MRSA auch bei Personen ohne prädisponierende Faktoren manifeste Infektionserkrankungen wie z. B. nekrotisierende Pneumonien hervorrufen (Herold *et al.*, 1998, Francis *et al.*, 2005, DeLeo *et al.*, 2010). Die Ursachen des im Vergleich zu nosokomial erworbenen *S. aureus*-Stämmen höheren pathogenen Potentials bleibt jedoch weiterhin Gegenstand der Diskussion. CA-MRSA-Stämme tragen im Gegensatz zu HA-MRSA-Isolaten häufiger Gene, die für das *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) kodieren (Naimi *et al.*, 2003). Obwohl eine Assoziation zwischen PVL und nekrotisierender Pneumonie festgestellt werden konnte (Labandeira-Rey *et al.*, 2007), wird dessen Rolle in der Pathogenese von CA-MRSA weiterhin kontrovers diskutiert (Said-Salim *et al.*, 2005, Voyich *et al.*, 2006, Otto, 2010). Aktuell ist eine neue Gruppe an Virulenzfaktoren in den Blickpunkt des Interesses geraten, die einen bedeutenden Beitrag zu der zum Teil sehr hohen Virulenz

von CA-MRSA-Stämmen leisten könnten. Dabei handelt es sich um sezernierte Peptide, die strukturell den bereits bei *S. epidermidis* beschriebenen Phenol-löslichen-Modulinen ähneln und *in vitro* eine ausgeprägte lytische Aktivität auf Neutrophile Granulozyten aufweisen sowie mit einer signifikant erhöhten Pathogenität und Mortalität im Tiermodell assoziiert sind (Mehlin *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2007). Eine erhöhte *in vitro*-Produktion Phenol-löslicher Moduline konnte kürzlich auch für klinische MRSA-Isolate aus Haut- und Weichteilinfektionen nachgewiesen werden (Berlon *et al.*, 2015).

1.5 Virulenz-assoziierte Faktoren von *Staphylococcus aureus*

Die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* liegt in einem breit aufgestellten Repertoire an Virulenzfaktoren begründet (Lowy, 1998). Durch zahlreiche Interaktionsmöglichkeiten mit Wirtsfaktoren kann es unter für Staphylokokken günstigen Umständen zu einer raschen Invasion und Dissemination der Keime kommen. In diesem Fall ist die volle Entfaltung des virulenten Potentials von *S. aureus* möglich (Lowy, 1998). Vielfältige Mechanismen schützen den Keim dabei vor einer primären Elimination durch das angeborene Immunsystem (Zecconi und Scali, 2013).

Das breite Spektrum Virulenz-assoziiierter Faktoren von *S. aureus* lässt sich nach Art und Funktion in verschiedene Gruppen einteilen. Toxine, Adhäsine und Invasine zählen ebenso dazu, wie eine Vielzahl an verschiedenen Enzymen und Faktoren, die *S. aureus* eine Immunevasion ermöglichen (Zecconi und Scali, 2013, Otto, 2014). Zahlreiche Virulenzfaktoren des hoch-redundanten Systems vereinen mehr als nur eine Funktion in sich, sodass es in einem Klassifikationssystem immer zu Schnittmengen zwischen den Untergruppen kommt. Eine prominente Untergruppe stellen Faktoren mit Bindungskapazität für Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) dar. Darunter finden sich Proteine, die ihre Wirkung zellwandassoziiert entfalten, die MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Foster *et al.*, 2014). Bei den SERAMs (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) handelt es sich um sezernierte Proteine mit verschiedenen Pathogenitätsfunktionen (Chavakis *et al.*, 2005, Bartlett und Hulten, 2010) (vgl. Abschnitte 1.5.4 und 1.5.5).

1.5.1 Toxine und Toxin-vermittelte Erkrankungen

Als Toxine werden jene Virulenzfaktoren bezeichnet, die eine direkt schädigende Wirkung auf den Wirtsorganismus ausüben (Otto, 2014). Dazu zählen neben Faktoren mit membranschädigenden, zytolytischen Effekten, wie die Hämolysine und Leukozidine, die Gruppe der hitzestabilen Enterotoxine, die als Superantigene fungieren (insbesondere das *Toxic Shock Syndrome Toxin* (TSST)). Ein prominenter Vertreter der Toxine mit zytolytischer Wirkung ist das α -Toxin (α -Hämolysin). Durch Formierung von Poren in Zellmembranen von Erythrozyten, Neutrophilen, Lymphozyten u. a., kommt es durch Efflux von Metaboliten (z. B. ATP) und Ionen (z. B. K^+) zu einer direkten Zellschädigung (Valeva *et al.*, 1997, Berube und Bubeck Wardenburg, 2013). Strukturell ähnliche Toxine sind die Leukozidine LukAB und LukDE, sowie das *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) (Otto, 2014). Zytolytische Wirkung weisen auch β -, γ -, δ -Hämolysine auf (Kaneko und Kamio, 2004). Lebensmittelvergiftungen, verursacht durch *Staphylococcus aureus*, stellen Gesundheitssysteme weltweit nicht nur in ökonomischer Hinsicht vor enorme Herausforderungen. Eine Ursache hierfür sind die hitzestabilen Enterotoxine (Balaban und Rasooly, 2000, Kadariya *et al.*, 2014). Übelkeit, Erbrechen und abdominelle Krämpfe sind als Hauptsymptome auf eine fokale, intestinale Inflammation durch Zytokinhyperproduktion zurückzuführen (Murray, 2005, Kadariya *et al.*, 2014).

Eine lebensbedrohliche, Toxin-vermittelte Erkrankung stellt das *Toxic Shock Syndrome* dar. Dieses manifestiert sich symptomatisch durch Fieber, Exanthem und Hypotonie sowie einem Multiorganversagen unter Beteiligung von mindestens drei der folgenden Organsysteme: Gastrointestinaltrakt, Leber, Nieren, Muskulatur, Schleimhäute, zentrales Nervensystem (RKI, 2009). Ätiologisch verantwortlich für die typische Symptomatik sind die Enterotoxine mit superantigenen Eigenschaften. Hauptvertreter dieser Gruppe ist das TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*). Das Toxin führt über eine unspezifische Bindung von MHC Klasse II-Rezeptoren zusammen mit einer Erkennung von T-Zell-Rezeptoren zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen aus Gewebsmakrophagen und T-Zellen, sowie der exzessiven Expansion von T-Zell-Klonen (Murray, 2005).

Toxin-vermittelt ist auch das akut lebensbedrohliche *Staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS). Die von 5 % der *S. aureus*-Stämme gebildeten exfoliativen Toxine ETA

und ETB führen durch die Lösung der Keratinozytenadhäsionen im Stratum granulosum zu einer intraepidermalen Spaltbildung und damit zu großflächigen Blasenbildungen (Hanakawa *et al.*, 2002, Handler und Schwartz, 2014).

1.5.2 Mechanismen der Immunevasion

Die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* wird nicht nur durch Faktoren vermittelt, die eine direkt schädigende Wirkung auf den Wirtsorganismus ausüben, wie es bei den Toxinen der Fall ist. Im Wechselspiel zwischen Wirtsabwehr und Pathogenen spielen auch Mechanismen eine Rolle, die eine Elimination der Staphylokokken durch das Immunsystem verhindern oder erschweren (Foster, 2005). Das Arsenal der primären angeborenen Wirtsabwehr gegenüber Erregern setzt sich im Wesentlichen aus drei Komponenten zusammen: Den antimikrobiellen Peptiden, dem Komplementsystem und der Phagozytose (Roosjakkers *et al.*, 2005). Mit einem ebenso breiten, wie vielfältigen Repertoire an Immunevasionsfaktoren ist *S. aureus* in der Lage, dieses hochspezialisierte und redundante System auf allen Ebenen auszuhebeln und zu unterlaufen (Zecconi und Scali, 2013).

Kapsuläre Polysaccharide (CP) spielen eine Schlüsselrolle in der antiphagozytischen Aktivität von *S. aureus* (O’Riordan und Lee, 2004). Der Schutz vor opsonophagozytischer Elimination wird dabei hauptsächlich durch CP 5 und CP 8 vermittelt (Nanra *et al.*, 2013).

Die Immunevasion und Persistenz von Staphylokokken ist auch mit Small Colony Variants (SCV) assoziiert. Dabei handelt es sich um Subpopulationen von *S. aureus*, die mit chronisch rezidivierenden Staphylokokken-Infektionen assoziiert sind (Proctor *et al.*, 1995, Kahl *et al.*, 1998). Sie unterscheiden sich phänotypisch vom Wildtyp u. a. in einem geänderten Profil an exprimierten Virulenzfaktoren (Vaudaux *et al.*, 2002), metabolische Defekte, einer geringeren Pigmentierung und Hämolyse (Sendi und Proctor, 2009) sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika (Chuard *et al.*, 1997). SCV zeichnen sich durch die ausgeprägte Fähigkeit der intrazellulären Persistenz aus und rufen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich reduzierte Immunantwort hervor, was sie vor einer schnellen Elimination durch das angeborene Immunsystem schützt (Tuchscherer *et al.*, 2010).

Die Fähigkeit der Persistenz von *S. aureus* im Wirtsgewebe beruht darüber hinaus auf einer weitgehenden Resistenz gegenüber Lysozym, das enzymatisch β -1,4-glykosidische

Bindungen im Murein der bakteriellen Zellwand spaltet und konsekutiv zu einer Zelllyse führt (Masschalck und Michiels, 2003). Molekulare Grundlage der Unempfindlichkeit von *S. aureus* stellt eine Peptidoglykan-Modifikation dar, die durch die O-Acetyltransferase OatA vermittelt wird (Bera *et al.*, 2005).

Eine detaillierte Darstellung zahlreicher weiterer Immunevasionsfaktoren von *S. aureus* bietet der Übersichtsartikel von Zecconi und Scali (Zecconi und Scali, 2013).

1.5.3 Sekretom und Sekretionssysteme von *S. aureus*

Virulenz-assoziierte Proteine von *S. aureus* können ihrer Funktion nur gerecht werden, wenn sie ihre Wirkung an dem für sie bestimmten Ort entfalten können. Nach bioinformatischer Vorhersage sollten 30 % des Proteoms von *S. aureus* sezerniert werden, wobei tatsächlich 41 % der Proteine sezerniert werden (Sekretom) und damit ein bedeutsames Reservoir an potentiellen Virulenzfaktoren darstellen (Kusch und Engelmann, 2014). Die Mehrzahl der sezernierten Proteine werden Sec-abhängig über die zytoplasmatische Membran transloziert (Schneewind und Missiakas, 2012). Auch wenn der Mechanismus der Proteintranslokation über bakterielle Membranen am detailliertesten für *E. coli* und *B. subtilis* untersucht ist (de Keyzer *et al.*, 2003, Tjalsma *et al.*, 2004), lassen vergleichende Genom-Analysen den Schluss zu, dass sich *S. aureus* dazu ähnlicher Strukturen und Mechanismen bedient (Sibbald *et al.*, 2006). Der Sec-Weg lässt sich nach dem Übersichtsartikel von de Keyzer vereinfacht in folgende Schritte gliedern (de Keyzer *et al.*, 2003): Über eine N-terminale Erkennungssequenz (Signalsequenz) werden die Proteine bereits während der Translation mittels Export-spezifischer Chaperone (SRPs; *Signal recognition particles*) selektiv zur Plasmamembran transportiert. Daran schließt sich die Translokation der Polypeptidketten durch spezifische Sec-Proteine an. Das entstehende Protein wird dabei durch einen in die Plasmamembran integrierten Translokationskanal dirigiert. Dieser setzt sich aus den Proteinen SecY, SecE und SecG zusammen. Die Energie für diesen Prozess wird durch die zytosolisch lokalisierte ATPase SecA bereitgestellt. Das Signalpeptid wird bereits kurz nach Beginn der Translokation durch spezifische Signalpeptidasen (SPasen) abgespalten (de Keyzer *et al.*, 2003). Katalytische Aktivität konnte bei *S. aureus* für die Typ 1-SPase SpsB nachgewiesen werden (Cregg *et al.*, 1996). Da das Protein posttranslokational in ungefaltetem Zustand der Aktivität von Proteasen ungeschützt ausgeliefert ist, erfolgt im letzten Schritt die Faltung und damit die

Überführung der Polypeptidkette in den funktionell nativen Zustand. PsrA, ein Lipoprotein, das Homologien mit Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aufweist, trägt zur effizienten Sekretion translozierter Proteine bei, indem es deren korrekte Faltung unterstützt (Sarvas *et al.*, 2004, Sibbald *et al.*, 2006).

1.5.4 MSCRAMMs

Zellwandassoziierte Proteine von *S. aureus* weisen eine in Funktion und Art hohe Variabilität und Vielfältigkeit auf. In ihrer Gesamtheit vermitteln sie von Adhäsion über Invasion bis hin zur Immunevasion zahlreiche Virulenz-assoziierte Eigenschaften von *S. aureus* (Foster *et al.*, 2014). Eine große Bedeutung kommt der Untergruppe der MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) zu, die zu den Adhäsinen gehören (Patti *et al.*, 1994). Als Zellwand-verankerte Proteine sind sie kovalent an das Peptidoglykan der bakteriellen Murein-Schicht gebunden. Sortase A, eine Transpeptidase, erkennt dabei eine C-terminal lokalisierte Sequenz der sezernierten Polypeptide (LPXTG) (Ilangoan *et al.*, 2001) und führt über deren Spaltung zu einer kovalenten Bindung des entsprechenden Proteins an die Pentaglycin-Brücke im bakteriellen Murein (Ton-That *et al.*, 1999, Marraffini *et al.*, 2006). Sortase A trägt als Virulenzfaktor in erheblichen Ausmaß zur Pathogenität von *S. aureus* bei (Mazmanian *et al.*, 2000, Cheng *et al.*, 2009). Sie stellt deshalb auch einen attraktiven therapeutischen Angriffspunkt dar (Cascioferro *et al.*, 2015).

Bedingt durch ihre Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix zu binden, tragen MSCRAMMs vermittelt durch die Adhärenz nicht nur zur Persistenz von *S. aureus* als harmloser Kommensale bei, sondern ermöglichen unter prädisponierenden Faktoren auch die Invasion und Dissemination im Wirtsgewebe (Foster *et al.*, 2014). Die initiale Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtsgewebes stellt dabei einen ersten und entscheidenden Schritt im Infektionsgeschehen dar (Joh *et al.*, 1999). Wichtige Vertreter aus der Gruppe der MSCRAMMs samt Zielstruktur und Funktion sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

EINLEITUNG

Tabelle 1.1: Übersicht zu MSCRAMMs (Tabelle modifiziert nach Foster *et al.*, 2014)

Protein	Zielstruktur	Funktion	Referenzen
ClfA	Fibrinogen, Komplementfaktor 1	Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Immunevasion	(Deivanayagam <i>et al.</i> , 2002, Ganesh <i>et al.</i> , 2008, Hair <i>et al.</i> , 2008, Hair <i>et al.</i> , 2010)
ClfB	Fibrinogen, Keratin 10, Loricrin	Adhäsion an abgestoßene Epithelzellen, nasale Kolonisation	(Walsh <i>et al.</i> , 2008, Ganesh <i>et al.</i> , 2011, Mulcahy <i>et al.</i> , 2012)
SdrC	Nasale, abgestoßene Epithelzellen	Nasale Kolonisation	(Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
SdrD	Nasale, abgestoßene Epithelzellen	Nasale Kolonisation	(Corrigan <i>et al.</i> , 2009)
SdrE	Komplementfaktor H	Immunevasion, Degradation von C3b	(Sharp <i>et al.</i> , 2012)
FnBPA und FnBPB	Fibrinogen, Elastin, Fibronectin	Adhäsion, zelluläre Invasion	(Joh <i>et al.</i> , 1999, Sinha <i>et al.</i> , 1999, Pilka <i>et al.</i> , 2006, Keane <i>et al.</i> , 2007)
Cna	Kollagen, Komplementfaktor C1q	Adhäsion an Kollagen, Inhibition des klassischen Weges der Komplementaktivierung	(Zong <i>et al.</i> , 2005, Kang <i>et al.</i> , 2013)

Tabelle modifiziert nach Foster et al., 2014 (Foster et al., 2014)

1.5.5 SERAMs

Eine zentrale Rolle in der Manifestation Staphylokokken-bedingter Erkrankungen spielen neben den Zellwand-assoziierten Faktoren (MSCRAMMs) auch sezernierte Proteine, die keine kovalente Bindung zur Zellwand aufweisen. Darunter finden sich Proteine mit Bindungskapazität für Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibrinogen, Fibronectin und Kollagen. Moleküle, die diese Eigenschaften aufweisen werden in der Gruppe der SERAMs (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) zusammengefasst (Chavakis *et al.*, 2005). In Tabelle 1.2 findet sich eine Übersicht wichtiger Proteine dieser Gruppe.

EINLEITUNG

Tabelle 1.2: Übersicht zu wichtigen SERAMs (nach Chavakis *et al.*, 2005)

Protein	Bindung von	Funktion	kDa	Referenzen
Coa	Prothrombin, Fibrinogen	Plasmakoagulation	87	(McDevitt <i>et al.</i> , 1992)
vWbp	von Willebrand-Faktor, Prothrombin, Fibrinogen, Fibronectin	Plasmakoagulation	66	(Bjerketorp <i>et al.</i> , 2002, Bjerketorp <i>et al.</i> , 2004, Thomer <i>et al.</i> , 2013)
Emp	Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Kollagen	Adhäsion von <i>S. aureus</i> an Fibrinogen und Fibronectin	38,5	(Hussain <i>et al.</i> , 2001a)
Efb	Fibrinogen, Komplementfaktor C3	Inhibiert die Plättchenaggregation, Komplementinhibition	19	(Boden und Flock, 1994, Palma <i>et al.</i> , 2001, Lee <i>et al.</i> , 2004b)
Eap	Fibrinogen, Fibronectin, Prothrombin, ICAM-I	Adhäsion an ECM-Moleküle, Inhibition der endothelialen Diapedese Neutrophiler Granulozyten	60	(Jonsson <i>et al.</i> , 1995, Palma <i>et al.</i> , 1999, Chavakis <i>et al.</i> , 2002, Harraghy <i>et al.</i> , 2003, Hagggar <i>et al.</i> , 2004, Hussain <i>et al.</i> , 2008)

Tabelle modifiziert nach Chavakis et al. (Chavakis et al., 2005)

1.5.5.1 Staphylokoagulase (Coa) und von Willebrand-Faktor-Bindeprotein (vWbp)

Hämostase als Schutzmechanismus des Körpers tritt nicht nur infolge eines physikalischen Traumas mit Gefäßverletzungen auf, sondern kann auch infolge einer inflammatorischen Reaktion auf eindringende Mikroorganismen aktiviert werden. Sie stellt damit einen genuinen Abwehrmechanismus gegenüber invadierenden mikrobiellen Pathogenen dar (Levi *et al.*, 2003, Krarup *et al.*, 2007, Loof *et al.*, 2011, van der Poll und Herwald, 2014). Physiologischerweise führt die Endstrecke der Gerinnungskaskade zu einer proteolytischen Spaltung von Prothrombin, das wiederum als Thrombin Fibrinogen spaltet. Die dadurch entstehenden unlöslichen Fibrinmonomere polymerisieren spontan zu einem Fibrinnetz (Adams und Bird, 2009). Um die unkontrollierte Bildung von Fibringerinnenseln zu verhindern, ist diesem letzten Schritt eine präzise gesteuerte Aktivierungskaskade vorgeschaltet, die in einem feinjustierten System aus sich proteolytisch aktivierenden Gerinnungsfaktoren eine exakte zeitliche und örtliche Limitation der Fibrinbildung sicherstellt (vgl. Abbildung 1.2). Diesem prokoagulatorischen System steht ein ebenso ausgefeiltes wie vielfältiges Faktorenspektrum gegenüber, das mit lytischen und antikoagulatorischen Effekten ein

Gegengewicht gewährleistet und damit eine Balance garantiert. *Staphylococcus aureus* sezerniert mit Coa und vWbp zwei Koagulasen, die Prothrombin im Gegensatz zum physiologischen Weg in nicht-proteolytischer Weise aktivieren und hebelt damit sämtliche vorgeschalteten Kontrollmechanismen der Fibrinbildung aus. Während die Staphylokoagulase (Coa) bereits lange bekannt ist und die Mechanismen ihrer Wirkung ausführlich beschreiben wurden (Kawabata *et al.*, 1985), wurde das von Willebrand-Faktor Bindeprotein (vWbp) erst 2002 entdeckt und 2004 in seiner Eigenschaft als Koagulase enthüllt. Ursächlich für die prokoagulatorische Wirkung beider Proteine ist die Interaktion N-terminaler Domänen mit dem Zentrum Prethrombin 2 von Prothrombin, die zu einer allosterischen Konformationsänderung führt und den so entstandenen aktiven 1:1-Komplexen eine direkte Spaltung von Fibrinogen ermöglicht (Friedrich *et al.*, 2003, Panizzi *et al.*, 2004). Obwohl das Phänomen der gerinnungsfördernden Aktivität bestimmter Bakterien und deren Assoziation mit einer erhöhten Virulenz schon lange bekannt ist (Loeb, 1903, Chapman *et al.*, 1934), erscheint es zunächst widersprüchlich, dass *S. aureus* damit einen genuinen Abwehrmechanismus des Wirtes gezielt fördert und verstärkt. Tatsächlich mehren sich aber in letzter Zeit Hinweise, dass *S. aureus* die im Blut als inaktive Zymogene vorhandenen Gerinnungsfaktoren für das Überleben und die Vermehrung im Wirtsgewebe gezielt ausnutzt und strategisch einsetzt (Cheng *et al.*, 2010, Thomer *et al.*, 2013). So wird die Pathogenese der durch *S. aureus* bedingten Endokarditis im Tiermodell maßgeblich durch Coa und vWbp beeinflusst (Panizzi *et al.*, 2011). Hingegen ging eine Expression von Coa in dem weniger virulenten Stamm *Streptococcus gordonii* weder mit einer erhöhten Bindung an Plättchen-Fibrin-Gerinnsel einher, noch konnte in einem *in vivo*-Endokarditis-Modell eine erhöhte Infektiosität nachgewiesen werden (Stutzmann Meier *et al.*, 2001). Eine Rolle spielen die beiden Koagulasen in der Pathogenese von Abszessen und im Verlauf der grampositiven Sepsis (Cheng *et al.*, 2010, McAdow *et al.*, 2011). Cheng *et al.* konnten in Maus-Milz-Abszessen die Kolo-kalisation von Prothrombin/Fibrinogen und Coa/vWbp immunhistochemisch nachweisen. Mit den selben affinitätschromatographisch aufgereinigten polyklonalen α -Coa und α -vWbp Kaninchen-Antikörpern konnte im Maus-Infektionsmodell eine protektive Immunität nachgewiesen werden (Cheng *et al.*, 2010).

In einem mit Fibrinogen supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/F) lässt sich Coa im Bereich der Pseudokapsel nachweisen, einer der *S. aureus*-Mikrokolonie direkt

anliegenden Fibrin-Struktur, die Neutrophile Granulozyten „mechanisch“ am Zugang zur Staphylokokken-Mikrokolonie hindert (Guggenberger *et al.*, 2012).

Bedingt durch ihre Eigenschaften, können Coa und vWbp einer neuen Gruppe von bifunktionellen Proteinen, den ZAAPs (*Zymogen activator and adhesion proteins*) zugeordnet werden, deren N-terminale Domänen als nicht-proteolytische Zymogenaktivatoren wirken, während C-terminale Abschnitte eine Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix vermitteln (Panizzi *et al.*, 2004). Für beide Koagulasen kann eine Bindung an Prothrombin, Fibrinogen und Fibronectin nachgewiesen werden, während die Bindung und nicht-proteolytische Aktivierung von Faktor XIII spezifisch für vWbp ist (Thomer *et al.*, 2013). Abbildung 1.2 stellt schematisch und vereinfacht den physiologischen Ablauf der Gerinnungskaskade zusammen mit deren pathologischer Aktivierung durch die beiden Koagulasen Coa und vWbp dar. Die Bindung von vWbp an den von Willebrand-Faktor (vWF) trägt unabhängig von der Fibrinbildung zu einer Adhärenz von *S. aureus* an aktivierte Endothelzellen im Blutfluss und an die subendotheliale Matrix bei (Claes *et al.*, 2014). vWF ist ein Glykoprotein, das physiologischerweise zur Hämostase beiträgt, indem es Thrombozyten an den Ort einer Gefäßverletzung bindet (Sadler, 1998).

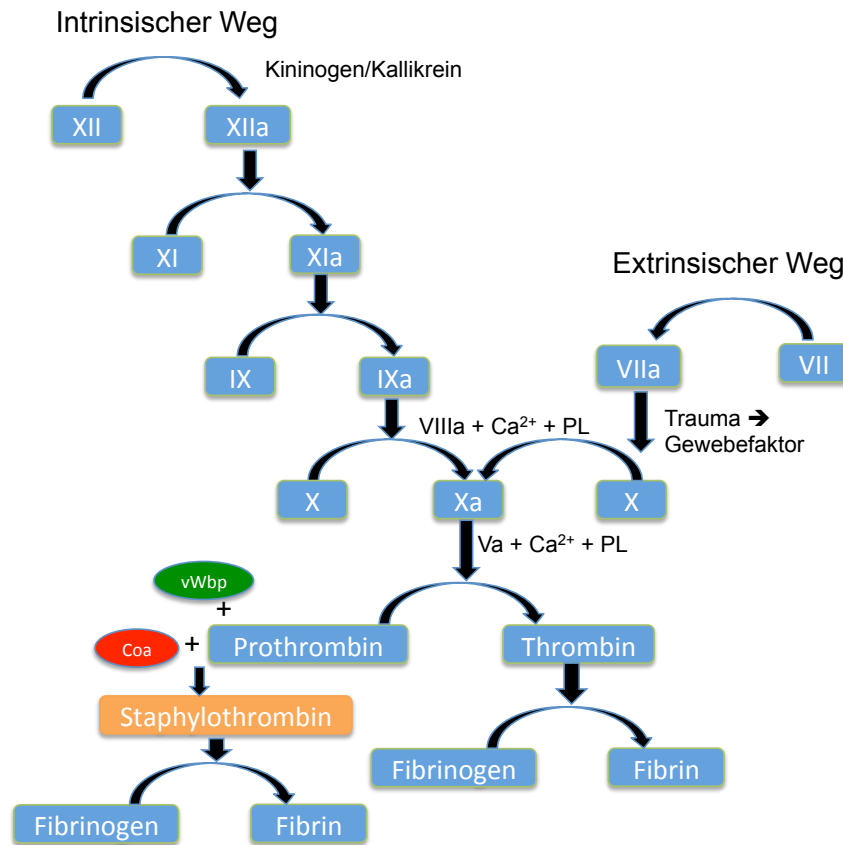


Abbildung 1.2: Gerinnungskaskade mit pathologischer Aktivierung durch Coa und vWbp

Die Gerinnungskaskade kann über zwei Wege aktiviert werden, die untereinander vielfach vernetzt sind und in eine gemeinsame Endstrecke münden: Der extrinsische Weg führt über ein Gewebetrauma zur Exposition des Gewebefaktors (TF). Es kommt zur Bildung des extrinsischen Tenase-Komplexes (VIIa:TF). Dieser aktiviert Faktor X zu Xa und Faktor IX zu IXa. Faktor IXa bildet zusammen mit Faktor VIIIa den intrinsischen Tenase-Komplex. Auf der Oberfläche einer Phospholipidmembran (PL) und in Anwesenheit von Calcium-Ionen führt er zu einer verstärkten Bildung von Faktor Xa. In Kolokalisation mit dem Prothrombinase-Komplex (Xa:Va) hat dies eine vermehrte Bildung von Thrombin zur Folge. Thrombin spaltet von Fibrinogen die unlöslichen Fibrinmonomere ab, die die Grundlage für einen stabilen Thrombus sind. Eine mechanische Stabilisierung erfolgt durch Faktor XIIIa, der die Fibrinmonomere kovalent quervernetzt. Der intrinsische Weg wird über eine Aktivierung von Faktor XII durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen ausgelöst und führt über eine Aktivierung von Faktor XI, IX und X in die gemeinsame Endstrecke. Die *S. aureus*-Koagulasen Coa und vWbp aktivieren Prothrombin nicht-proteolytisch. Der entstandene Komplex (Staphylothrombin) führt zur Bildung der unlöslichen Fibrinprodukte. Abbildung und Beschreibung sind modifiziert nach dem Übersichtsartikel von Adams und Bird (2009) dargestellt. (Adams und Bird, 2009).

1.5.5.2 Extrazelluläres Matrix-Bindeprotein (Emp)

Das Extrazelluläre Matrix Bindeprotein (Emp) wurde erstmals 2001 von Hussain *et al.* als ein 38,5 kDa großes extrazelluläres Protein mit Bindungskapazität für Proteine der extrazellulären Matrix beschrieben (Hussain *et al.*, 2001a). Es ist ein nicht-kovalent gebundenes Oberflächenprotein, das hauptsächlich in der stationären Phase exprimiert wird (Hussain *et al.*, 2001a). Interaktionen konnten für Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronektin nachgewiesen werden (Hussain *et al.*, 2001a). Auch wenn Emp in den meisten Publikationen in einem Zug mit dem weitaus besser untersuchten „Schwesterprotein“ Eap (Extrazelluläres Adhärenzprotein) aufgeführt wird, ist seine Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen alles andere als vollständig verstanden. Beide Proteine (Emp und Eap) werden in ihrer Expression entscheidend durch SaeRS (*S. aureus exoprotein expression*) beeinflusst, einem wichtigen Zweikomponenten-Sensor-Regulator, der die Expression von Staphylokokken-Exoproteinen kontrolliert (Harraghy *et al.*, 2005). Cheng *et al.* konnten eine Beteiligung von Emp an der Pathogenese von Weichteilabszessen nachweisen (Cheng *et al.*, 2009). Die Bildung von Biofilmen unter Eisenmangelbedingungen, eine für Staphylokokken typische Form des Wachstums auf Polymer-Oberflächen, erfordert neben zahlreichen anderen Faktoren auch die Produktion von Emp und Eap (Johnson *et al.*, 2008). Auf das Wachstum und die Morphologie von *S. aureus*-Mikrokolonien, sowie deren assoziierte Strukturen in einem mit Fibrinogen supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/F) hat Emp jedoch keinen Einfluss (Guggenberger *et al.*, 2012).

1.5.5.3 Extrazelluläres Fibrinogen-Bindeprotein (Efb)

Das 19 kDa große Extrazelluläre Fibrinogen-Bindeprotein (Efb) wurde erstmals 1989 in seiner Eigenschaft als Fibrinogen-bindendes Protein (zu diesem Zeitpunkt noch als „Fib“ bezeichnet) beschrieben (Boden und Flock, 1989). 1994 folgten Sequenzierung und Klonierung, wobei N-terminale Homologien zu C-terminalen Abschnitten der Staphylokoagulase enthüllt wurden (Boden und Flock, 1994). Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht abzusehen, dass dieses kleine Protein eine weitaus raffiniertere Rolle im breiten Virulenz-Spektrum von *S. aureus* spielen sollte, als seine Größe und primären Charakteristika annehmen ließen. Efb hat neben seiner N-terminalen Fibrinogen-Bindestelle noch einen C-terminal lokalisierten Bereich, der ebenfalls zur Bindung von Fibrinogen in der Lage ist. Aufgrund dieser bivalenten Bindungseigenschaft führt eine

Zugabe von Fibrinogen im molaren Verhältnis 1:1 zu einer Präzipitation von Efb (Palma *et al.*, 1998, Wade *et al.*, 1998). Die C-terminale Bindestelle von Efb für Fibrinogen konnte jedoch in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden (Lee *et al.*, 2004b). Efb interagiert mit der A α -Kette des D-Fragmentes von Fibrinogen (Palma *et al.*, 2001). Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das mit einem Molekulargewicht von 340 kDa mehr als 21-mal so groß wie sein Interaktionspartner Efb ist (Wade *et al.*, 1998). Es setzt sich aus zwei gleichen Hälften zusammen, die jeweils durch die drei Polypeptidketten A α , B β und γ gebildet werden und über Disulfidbrücken verbunden sind (Blomback und Blomback, 1972). Strukturell wird das symmetrisch aufgebaute Fibrinogenmolekül in drei globuläre Domänen gegliedert: eine zentrale E-Domäne und zwei davon ausgehende distale D-Domänen (Doolittle, 1984). Seine physiologische Funktion beschränkt sich nicht nur auf die Bildung von unlöslichen Fibrinmonomeren und den dadurch ausgelösten hämostatischen Effekt. Fibrinogen trägt als Ligand durch Bindung an den Thrombozyten-Rezeptor GP IIb/IIIa auch zur Plättchen-Quervernetzung und damit zur mechanischen Stabilisierung von Thromben bei (Bennett *et al.*, 1983). Efb greift in diesen Prozess ein, indem es eine verstärkte Bindung von Fibrinogen an ADP-aktivierte Thrombozyten vermittelt und dadurch einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation hervorruft (Palma *et al.*, 2001). Fibrinogen ist als Akute-Phase-Protein neben seiner Rolle als hämostatisches Agens auch an der Vermittlung inflammatorischer Reaktionen und Wundheilungsprozessen beteiligt (Drew *et al.*, 2001, Cruz-Topete *et al.*, 2006). Die Interaktion von Fibrinogen mit dem Leukozyten-Integrin $\alpha_M\beta_2$ /Mac-1 trägt darüber hinaus entscheidend zur effizienten Eliminierung von Staphylokokken in der Peritonealhöhle bei (Flick *et al.*, 2004). Durch Bindung der N-terminalen Domäne von Efb (Efb-N) an das D-Fragment von Fibrinogen wird dessen Interaktion mit dem $\alpha_M\beta_2$ -Rezeptor verhindert und damit die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten (PMN) an immobilisiertes Fibrinogen vermindert. Die biologische Relevanz dieses Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (Ko *et al.*, 2011). Das Protein Efb zählt aufgrund seiner Fibrinogen-bindenden Eigenschaft funktionell zu den Adhäsinen und wird konstitutiv von allen in einer Studie getesteten *S. aureus*-Stämmen exprimiert (Boden Wastfelt und Flock, 1995). Auch wenn Efb keinen maßgeblichen Beitrag zur Bindungsfähigkeit von *S. aureus* an immobilisiertes Fibrinogen leistet und die Virulenz im Endokarditis-Tiermodell nicht maßgeblich durch Efb beeinflusst wird, konnte nachgewiesen werden, dass es in einem

Wundinfektionsmodell zu einer deutlichen Verzögerung der Heilung führt (Palma *et al.*, 1996). In einem Maus-Mastitis-Modell konnte durch die Immunisierung mit Efb ein protektiver Effekt erzielt werden (Mamo *et al.*, 1994).

Dass die Funktion des 19 kDa-Proteins als Virulenzfaktor nicht nur auf seinen adhäsiven Eigenschaften beruht, wurde erst 2004 enthüllt. Lee *et al.* wiesen nach, dass Efb einen wichtigen Abwehrmechanismus des Wirtes inhibiert: das Komplementsystem (Lee *et al.*, 2004a). Dieses System stellt einen phylogenetisch sehr alten und integralen Bestandteil der angeborenen Immunität dar. Es vermittelt nicht nur die Elimination eindringender Pathogene, sondern ist darüber hinaus an einer Vielzahl weiterer Prozesse, wie z. B. der Beseitigung von Immunkomplexen und geschädigten Zellen, sowie der Geweberegeneration beteiligt (Cho, 2015). Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch mehrere Auslöser und über unterschiedliche Wege erfolgen: den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Alle Wege führen in einem kaskadenartig regulierten Prozess zu einer Spaltung der Komplementfaktoren C3 in die Fragmente C3a und C3b, sowie C5 in C5a und C5b mit einer finalen Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC) unter Beteiligung der Faktoren C5b, C6, C7, C8 und C9. Der MAC führt zu einer Zelllyse (Sarma und Ward, 2011). Weitere Effektormechanismen des Komplementsystems sind die Auslösung einer inflammatorischen Reaktion durch die Anaphylatoxine C3a und C5a, sowie die Opsonisierung eindringender Pathogene (Hallstrom und Riesbeck, 2010). Auch *S. aureus* löst als invasives Pathogen die Komplementkaskade aus und erhöht damit die Effizienz seiner eigenen opsonophagozytischen Elimination durch das Immunsystem (Neth *et al.*, 2002). Es ist nicht verwunderlich, dass *S. aureus* auf diesen effizienten primären Abwehrmechanismus in kongenialer Weise reagiert und mit dem C3-Bindeprotein Efb zum Gegenschlag ausholt. Das Extrazelluläre Fibrinogen-Bindeprotein greift durch die Bindung und Inhibition von C3 und C3b in das Herzstück der Komplementkaskade ein, indem es zur Inhibition vorwiegend des Alternativen Aktivierungsweges führt (Hammel *et al.*, 2007). Die daraus resultierende verminderte opsonophagozytische Elimination von *S. aureus* kann auf eine reduzierte Deposition von C3b auf seiner Zelloberfläche zurückgeführt werden (Lee *et al.*, 2004a). Strukturelle Ursache der Inhibition ist eine Interaktion einer C-terminalen Domäne von Efb mit dem C3d-Fragment von C3/C3b (Lee *et al.*, 2004b). Kristallstrukturanalysen ergaben, dass die C3-Bindedomäne von Efb (Efb-C) das native C3 konformationell derart verändert,

dass es nicht mehr zum aktiven C3b prozessiert werden kann, wobei gleichzeitig bereits gebildetes C3b ebenfalls gebunden und in seiner Funktion als Opsonin inhibiert wird (Hammel *et al.*, 2007). Jongerius *et al.* konnten zeigen, dass Efb auch die C5-Konvertasen C4b2a und C3b₂Bb hemmt. Dies hat eine verminderte C5a-vermittelte Leukozytenaktivierung zur Folge (Jongerius *et al.*, 2007). In der selben Arbeit ließ sich in einer PCR-Analyse von 84 klinischen *S. aureus*-Isolaten und 6 klassischen Laborstämmen das Efb-kodierende Gen (*efb*) in 85 % der Fälle nachweisen.

Inhibition und Modulation des Komplementsystems als Strategie der Immunevasion stellt nicht nur für *S. aureus* eine zentrale Strategie der Immunevasion dar. Zahlreiche weitere Mikroorganismen bedienen sich dazu einer wirtseigenen Gruppe an Proteinen aus der RCA-Familie (Regulatoren der Komplementaktivierung), die physiologischerweise eine hemmende Wirkung auf das Komplementsystem ausüben und damit eine überschießende Aktivierung verhindern (Lindahl *et al.*, 2000). Mit Efb hat *S. aureus* einen Mechanismus entwickelt, der unter den zahlreichen Modulatoren der Komplementaktivierung ein Novum darstellt, indem er unter Umgehung der wirtseigenen Inhibitoren direkt inhibitorisch auf das Komplementsystem einwirken kann (Hammel *et al.*, 2007).

Das C3d-Fragment des Komplementfaktors C3 bindet den lymphozytären Rezeptor CR2, der auf B-Zellen, unreifen T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen exprimiert wird (Tsoukas und Lambris, 1993, Carroll, 2004). Das C3-Fragment stellt so ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar, das zur Aktivierung und Reifung von B-Zellen beiträgt. Ricklin *et al.* konnten zeigen, dass die Interaktion von C3d mit dem Komplementrezeptor 2 (CR) durch Efb-C inhibiert werden kann (Ricklin *et al.*, 2008).

In Zusammenschau des aktuellen Forschungsstandes lässt sich Efb als ein multifunktionelles Protein bezeichnen, das sich durch zahlreiche originelle Mechanismen und multiplen Angriffspunkten als besonders vielseitiger und in seiner Art beispielloser Virulenzfaktor von *S. aureus* auszeichnet. Abbildung 1.3 bietet einen schematischen und vereinfachten Überblick über die Interaktion von Efb mit dem Komplementsystem.

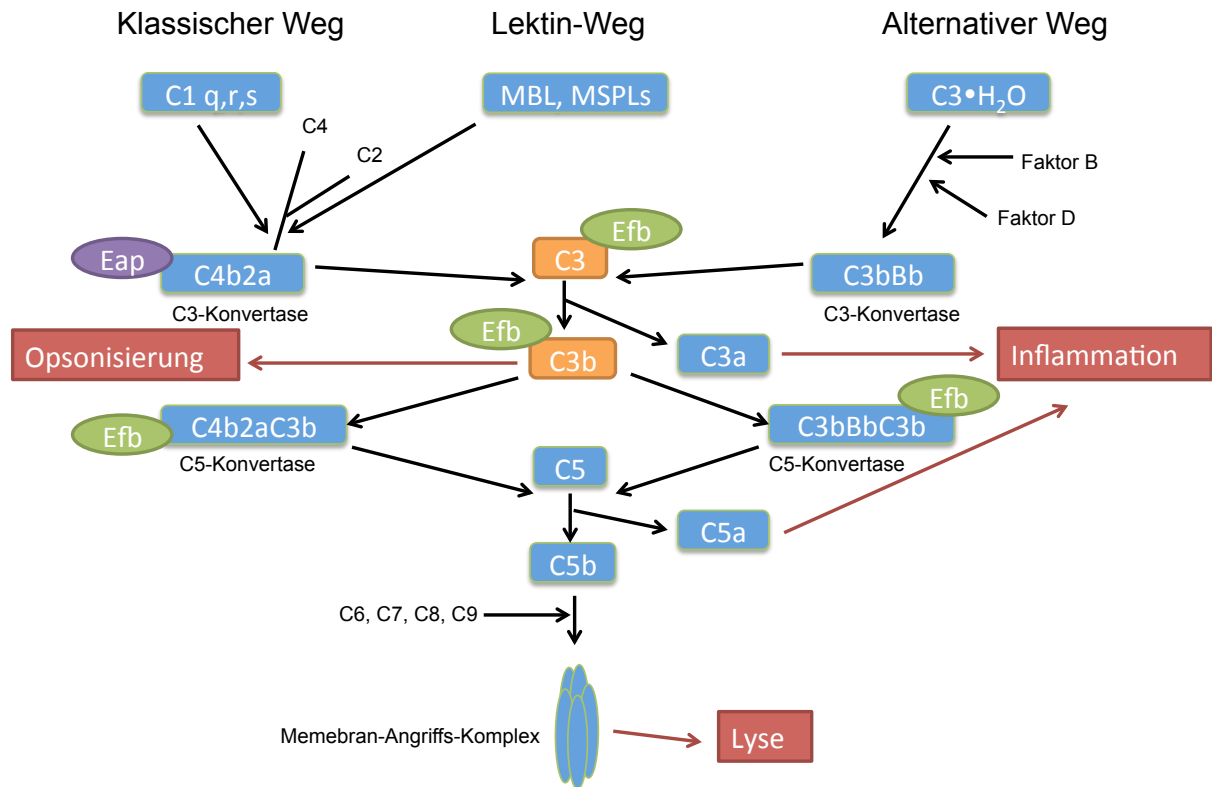


Abbildung 1.3: Komplementsystem in Interaktion mit den SERAMs Efb und Eap

Das Komplementsystem ist Bestandteil und integraler Vermittler angeborener Immunität. Es kann über drei Wege aktiviert werden: Den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Alle Wege führen zur Aktivierung der Komplementfaktoren C3 und C5, gefolgt von der finalen Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC), der eine Zelllyse herbeiführt. Der klassische Weg wird über an Pathogene gebundene Immunglobuline unter Beteiligung der Faktoren C1 q,r,s aktiviert. C1s spaltet die Faktoren C4 und C2 unter Bildung der C3-Konvertase C4b2a. Beim alternativen Weg bindet C3b direkt an fremde Oberflächen und führt zur Bildung der C3-Konvertase C3bBb. Der Lektin-Weg wird durch Mannan-bindende-Lektine (MBL) vermittelt. Diese sind an MBL-assoziierte Proteine (MASPs) gebunden. Die Bindung dieser Komplexe an Kohlenhydrate der Pathogenoberfläche führt zur Aktivierung der Faktoren C4 und C2 aus denen die C3-Konvertase C4b2a hervorgeht. *S. aureus* greift mit den Proteinen Eap und Efb hemmend in dieses komplexe System ein (vgl. Kapitel 1.5.5.3 und 1.5.5.4). Die Abbildung ist modifiziert nach Hallstrom und Riesbeck (2010). Beschreibung nach dem Übersichtsartikel zum Komplementsystem von Sarma und Ward (2011). (Hallstrom und Riesbeck, 2010, Sarma und Ward, 2011).

1.5.5.4 Extrazelluläres Adhärenz-Protein (Eap)

Das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) ist ein multifunktionelles Adhäsins aus der SERAM-Gruppe, das über ein vielseitiges Wirkungsspektrum verfügt und einen zentralen Vermittler der Virulenz von *S. aureus* darstellt. Mittels PCR-Analysen konnten Hussain *et al.* zeigen, dass Eap in 240 untersuchten klinischen *S. aureus*-Isolaten in Form zahlreicher analoger Proteine auftritt (Hussain *et al.*, 2001b). Dazu gehört auch ein 72 kDa großes Protein, das aufgrund seiner Sequenzhomologie zu einem Segment in der β -Kette des MHC Klasse II-Proteins als Map (MHC Klasse II-analoges Protein) bezeichnet wurde (Jonsson *et al.*, 1995, Harraghy *et al.*, 2003). Im Folgenden wird die Bezeichnung Eap verwendet. Das Bindungsspektrum des sezernierten Proteins umfasst zahlreiche Proteine der extrazellulären Matrix. Dazu zählen u. a. Fibrinogen, Fibronectin, Prothrombin, Vitronectin und Thrombospondin-1 (Palma *et al.*, 1999, Hussain *et al.*, 2008). Über die Bildung von Oligomeren ist es in der Lage Bakterien zu agglutinieren (Palma *et al.*, 1999). Auch wenn aufgrund der Redundanz der Adhäsine die Bindungsfähigkeit einer *eap*-Deletionsmutante an Fibrinogen und Fibrin nicht nennenswert beeinträchtigt ist, so ist deren Adhärenz an kultivierte Fibroblasten deutlich reduziert (Hussain *et al.*, 2008). Eap vermittelt über die Bindung des Integrins ICAM-I auch antiinflammatorische Effekte, indem es die Neutrophilen-Rekrutierung in einem bakteriellen Maus-Peritonitismodell 2 – 3-fach reduziert (Chavakis *et al.*, 2002). Darüber hinaus hemmt Eap die Adhärenz von Neutrophilen Granulozyten an endotheliale Zellen mit der Folge einer verminderten transendothelialen Migration (Hagggar *et al.*, 2004). Im Tiermodell beobachtete Wundheilungsstörungen sind wahrscheinlich maßgeblich auf die vielfältigen antiinflammatorischen Effekte von Eap zurückzuführen (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Die Adhärenz an Faktoren der extrazellulären Matrix stellt einen ersten wichtigen Schritt im Infektionsablauf dar. Die sich daran anschließende Internalisierung durch nicht-professionelle Phagozyten ermöglicht *S. aureus* eine weitgehend unbehelligte intrazelluläre Persistenz. Zentrale Vermittler dieses Prozesses sind die Fibronectin-Bindeproteine FnBPA und FnBPB (Joh *et al.*, 1999, Dziwanowska *et al.*, 2000). Dass auch Eap für die phagozytische Internalisierung von *S. aureus* in eukaryontische Zellen (Fibroblasten und epitheliale Zellen) ein bedeutender Faktor ist, konnten Hagggar *et al.* (2003) zeigen. In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass extern zugeführtes Eap die Internalisierung erhöhen und durch spezifische α -Eap-Antikörper geblockt werden kann (Hagggar *et al.*, 2003).

Die Inhibition des Komplementsystems unter Ausnutzung wirtseigener Modulatoren ist eine unter Mikroorganismen weit verbreitete Immunevasionsstrategie (Lambris *et al.*, 2008, Blom *et al.*, 2009). *S. aureus* setzt sich davon in beispielloser Weise ab, indem er dieses immunologisch wichtige System mit eigenen Proteinen auf verschiedenen Ebenen hemmt. Neben Efb, das bereits in Abschnitt 1.5.5.3 ausführlich beschrieben wurde, gehört auch Eap zu den Komplementinhibitoren. Im Gegensatz zu Efb, das C3b und C3b-enthaltende Konvertasen hemmt, bildet Eap hochaffine Komplexe mit C4b und inhibiert damit die Bildung der C3-Konvertase C4b2a, die aus dem Lektin- und dem klassischen Aktivierungsweg hervorgeht (Woehl *et al.*, 2014). Eine weitere Eigenschaft von Eap wurde erst kürzlich von Stapels *et al.* entdeckt: In ihrer Arbeit wurde Eap als spezifischer und potenter Inhibitor von neutrophilen Serin-Proteasen (NSPs) identifiziert (Stapels *et al.*, 2014). NSPs sind für die Abwehrfunktion Neutrophiler Granulozyten von entscheidender Bedeutung. Sie werden in azurophilen Granula gespeichert und vermitteln nicht nur die Beseitigung mikrobieller Pathogene, sondern tragen auch zur Regulation der Immunantwort bei und fördern damit die Wundheilung (Korkmaz *et al.*, 2010, Wilgus *et al.*, 2013).

1.6 Pathogenese der Abszessbildung

Die Formierung von Abszessen stellt einen wichtigen Pfeiler in der Pathogenese *S. aureus*-bedingter Infektionen dar (Cheng *et al.*, 2011). Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen steht deshalb nicht nur im Interesse der Identifikation neuer therapeutischer Angriffspunkte. Die Darstellung von Abszessen als fehlgesteuerte, unspezifische inflammatorische Antwort des Organismus auf biologische und physikalische Fremdkörper und Traumata wird neuerdings durch Modelle ergänzt, die ein großes Repertoire an beteiligten Virulenzfaktoren von *S. aureus* in Interaktion mit Faktoren der Wirtabwehr in ein feinabgestimmtes Gesamtbild der Pathogenese integrieren (Cheng *et al.*, 2009, Cheng *et al.*, 2011). Von der Bakteriämie bis hin zum reifen Abszess lassen sich demnach morphologische Stadien definieren, deren korrektes Durchlaufen ein jeweils spezifisches genetisches Repertoire erfordert. In der Frühphase der Bakteriämie kommt danach den Genen *clfA* und *clfB*, die für zwei *S. aureus*-Oberflächenproteine kodieren eine entscheidende Bedeutung für das Überleben im Blutstrom und letztlich der deponierten Menge an Staphylokokken in peripheren Geweben zu (Cheng *et al.*, 2009). Nach ca. 48 Stunden bilden sich lokalisierte Infiltrate

aus polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) und wenigen Bakterien. Die *Iron-restricted surface determinants*-Gene *isdA* und *isdB* (kodieren Häminbindungsproteine) sowie *sdrD* stellen in diesem Stadium einen entscheidenden Faktor für das Wachstum der Staphylokokken dar (Cheng *et al.*, 2009). Nach 4 – 5 Tagen ist eine komplexe Struktur entstanden, in deren Zentrum sich eine Ansammlung von Staphylokokken findet, umgeben von einer amorphen Pseudokapsel, die wahrscheinlich eine mechanische Barriere vor dem Zugriff von Leukozyten darstellt (Cheng *et al.*, 2009). Daran schließen sich Schichten aus nekrotischen und vitalen PMNs an, die durch eine Hülle aus eosinophilem Material von gesundem Gewebe getrennt werden. Dieses späte Stadium der Abszessgenese wird maßgeblich durch Protein A (*spa*) und Emp beeinflusst (Cheng *et al.*, 2009).

Entscheidenden Einfluss auf die korrekte Ausbildung der *S. aureus*-Weichteilabszesse nehmen auch die beiden Koagulasen Coa und vWbp. So konnten Cheng *et al.* zeigen, dass $\Delta coa/\Delta vwbp$ -Doppelmutanten im Maus-Infektionsmodell weder zur Bildung renaler Abszesse noch zur Persistenz im infizierten Gewebe in der Lage waren (Cheng *et al.*, 2010).

Einen potenten Einfluss auf die Entstehung purulenter Gewebeschmelzungen haben auch die kapsulären Polysaccharide CP5 und CP8 (Tzianabos *et al.*, 2001).

1.7 *Staphylococcus aureus*: Analyse in einer 3D-Kollagenmatrix (3D-CoG)

Das 3D-Kollagengel stellt eine relativ neue Methode zur *in vitro*-Untersuchung des Verhaltens mikrobieller Organismen und der Leukozytenmigration unter gewebeähnlichen Bedingungen dar (Friedl und Bocker, 2000, Behnsen *et al.*, 2007, Freund *et al.*, 2008, Lammermann *et al.*, 2008). Als Matrix dient dabei auspolymerisiertes Kollagen, das optional mit weiteren Faktoren supplementiert werden kann. In dem von Guggenberger *et al.* etablierten Modell zur Untersuchung verschiedener *S. aureus*-Stämme wurde das 3D-CoG mit humanem Fibrinogen supplementiert (3D-CoG/F) und optional zusätzlich mit Prothrombin versetzt (3D-CoG/FP) (Guggenberger *et al.*, 2012).

S. aureus Newman bildet im 3D-CoG die auch für das Wachstum in Weichgeweben typischen Mikrokolonien. Unter Anwesenheit von Fibrin (3D-CoG/F) werden diese von zwei spezifischen Barrieren umgeben, die ihnen einen „mechanischen“ Schutz vor einer Elimination durch Neutrophile Granulozyten bieten (Guggenberger *et al.*, 2012). Der

Kolonie direkt anliegend ist die Pseudokapsel lokalisiert, deren Bildung durch Coa über Fibrinbildung vermittelt wird. In der Ausdehnung weitaus größer ist das sich distal anschließende, maschenartig angeordnete Microcolony-associated Meshwork (MAM), das in Abhängigkeit von der Koagulase vWbp gebildet wird (Guggenberger *et al.*, 2012). Beide Strukturen enthalten zumindest partiell Fibrin, da sich durch Plasmin eine Auflösung der Strukturen herbeiführen lässt und deren Bildung durch den Thrombin-Inhibitor Argatroban blockiert werden kann (Guggenberger *et al.*, 2012). Das Modell ist dazu geeignet, spezifische Schritte der Pathogenese von Abszessen zu simulieren.

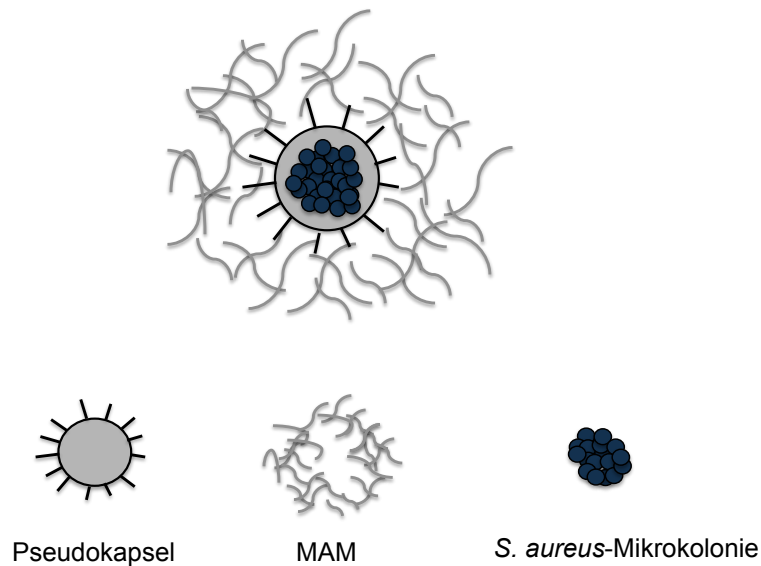


Abbildung 1.4: *S. aureus*-Mikrokolonie im 3D-CoG/F mit Pseudokapsel und MAM

Die Grafik stellt schematisch das für *S. aureus* typische Wachstum im 3D-CoG/F dar. Unter Anwesenheit von Fibrinogen bildet *S. aureus* Mikrokolonien, die von einer inneren Pseudokapsel und einem äußeren Microcolony-associated Meshwork (MAM) umgeben sind. Neutrophile Granulozyten werden so „mechanisch“ am Zugang zu der Mikrokolonie gehindert. Die Pseudokapsel wird in Abhängigkeit von Coa gebildet, während die Bildung des MAM durch vWbp vermittelt wird. Abbildung und Beschreibung nach Guggenberger *et al.* (2012).

1.8 Therapeutische Strategien bei *S. aureus*-Infektionen

Die Therapie und das Management Staphylokokken-bedingter Erkrankungen ist ein komplexer und vielschichtiger Prozess, der präventive Maßnahmen, chirurgische Interventionen sowie medikamentöse Strategien umfasst. Im Folgenden soll nur auf die pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten eingegangen werden.

1.8.1 Antibiotika

Eine wichtige Säule in der Behandlung von *S. aureus*-Infektionen stellen Antibiotika dar. Die Wirksamkeit der Therapie hängt dabei entscheidend von der korrekten Diagnose ab. Bedeutend ist dabei die Unterscheidung zwischen Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Stämmen (MSSA), die empfindlich gegen β -Lactamase-stabile Penicilline wie Oxacillin oder Flucloxacillin sind, und Methicillin-resistenten Stämmen (MRSA), die bedingt durch ein verändertes Penicillin-Binde-Protein (PBP2a) eine geringe Affinität zu β -Lactam-Antibiotika aufweisen und deshalb eine angepasste Therapie erfordern (RKI, 2014). Vancomycin ist bereits seit Jahrzehnten bekannt und seither in klinischem Einsatz. Nach wie vor stellt es einen unverzichtbaren Bestandteil der Therapie von MRSA-Infektionen dar (Holmes *et al.*, 2015). Es handelt sich um ein Glykopeptidantibiotikum, das durch Bindung an D-Alanyl-D-Alanin der Peptidoglykan-Vorläuferbausteine die Vernetzung der Zellwand verhindert (Reynolds, 1989, Courvalin, 2006). Das Auftreten von *S. aureus*-Stämmen mit intermediärer Vancomycin-Suszeptibilität (VISA: Minimale Inhibitorische Konzentration (MIC): 4 – 8 $\mu\text{g/ml}$ Vancomycin) und Vancomycin-Resistenz (VRSA: MIC: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ Vancomycin) macht jedoch den Einsatz und die Entwicklung alternativer Antibiotika und Therapieoptionen nötig (Howden *et al.*, 2010). Eine Kombination der älteren Antibiotika Rifampicin und Fusidinsäure ist in diesem Fall eine therapeutische Alternative (Howden *et al.*, 2010).

Lipoglykopeptide (Oritavancin, Telavancin und Dalbavancin) greifen wie Vancomycin inhibierend in die Peptidoglykansynthese ein und zeigen trotz des ähnlichen Mechanismus auch Wirkung gegen VISA und VRSA (Holmes *et al.*, 2015).

Mit Linezolid steht ein Antibiotikum aus der neuen Gruppe der Oxazolidinone zur Verfügung. Es blockiert die bakterielle Proteinsynthese, indem es die ribosomale 23S-rRNA im Zentrum der Peptidyltransferase bindet. So verhindert es die korrekte Platzierung der Aminoacyl-tRNA (Colca *et al.*, 2003, Leach *et al.*, 2007).

Eine weitere therapeutische Perspektive sind die neuen Anti-Staphylokokken-Cephalosporine Ceftarolin und Ceftobiprol, die gegen MSSA, MRSA und VISA wirksam sind. Diese sind auch deshalb von Bedeutung, da der Einsatz von β -Lactam-Antibiotika aufgrund der besseren Wirksamkeit bei *S. aureus*-Infektionen gegenüber Glykopeptiden bevorzugt werden sollten, falls keine Kontraindikation, wie z. B. Resistenzen oder Allergien bestehen (Holmes *et al.*, 2015). In einer Therapiestudie zur MSSA-Bakteriämie

war eine Behandlung mit Vancomycin im Vergleich zu einer Behandlung mit β -Lactam-Antibiotika mit einer signifikant höheren Mortalität assoziiert (Kim *et al.*, 2008).

Das zyklische Lipopeptid Daptomycin führt durch Kalium-Efflux und Depolarisation der bakteriellen Zellmembran zu einer Terminierung der DNA-, RNA-, und Proteinsynthese und kommt aufgrund dieses einzigartigen Wirkmechanismus als therapeutische Alternative bei MRSA-Infektionen in Betracht (Steenbergen *et al.*, 2005).

Die Streptogramine Quinupristin und Dalfopristin werden in Kombination (QD) in einem Verhältnis von 30:70 eingesetzt und blockieren synergistisch in zwei sequenziellen Schritten die Proteinsynthese am bakteriellen Ribosom (Di Giambattista *et al.*, 1989, Holmes *et al.*, 2015). Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen sind *in vitro* auch für MRSA-Isolate mit verminderter Vancomycin-Suszeptibilität sehr niedrig ($\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ QD) (Jevitt *et al.*, 2003).

Der Wirkmechanismus jedes neuen Antibiotikums wird früher oder später durch das auftreten resistenter Stämme ausgehebelt. Nicht zuletzt deshalb werden in Zukunft neben der Entwicklung neuer Antibiotika auch alternative therapeutische Strategien von großer Bedeutung sein (Clatworthy *et al.*, 2007).

1.8.2 Aktive Immunisierung gegen *S. aureus*

In Anbetracht der hohen Prävalenz, der teils schweren Verläufe und nicht zuletzt aufgrund der damit einhergehenden ökonomischen Belastungen für das Gesundheitssystem, wäre eine Impfung gegen *S. aureus* eine überaus attraktive und kosteneffektive präventive Maßnahme. Trotz enormer wissenschaftlicher Anstrengungen und zahlreichen Studien zu passiven und aktiven Immunisierungen unter Verwendung verschiedener Antigene, ist die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes für den Menschen bis heute nicht gelungen (Proctor, 2012, Fowler und Proctor, 2014). Um realistische Aussichten auf den Erfolg einer künftigen Impfung zu erhalten, ist die Frage nach den Ursachen dieses Scheiterns Grundlage intensiver Diskussionen. Ein Schlüssel dazu könnte die immunologische Reaktion auf *S. aureus* sein. Im Gegensatz zu Pathogenen, für die bereits erfolgreiche Vakzine verfügbar sind, wie z.B. *Haemophilus influenzae* Typ B, *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae*, ist der Mechanismus der Immunität gegen *S. aureus* noch nicht vollständig aufgeklärt (Proctor, 2012, Fowler und Proctor, 2014). Auf der Basis umfangreicher Literaturrecherchen schlagen Fowler und Proctor (2014) dafür ein Arbeitsmodell vor,

in dem nicht die humoralen Abwehrmechanismen (vor allem Antikörper) ausschlaggebend sind, sondern T-Helferzellen (T_H17-Zellen) und damit die Zellvermittelte Immunität Dreh- und Angelpunkt ist: Aktivierte T_H17-Zellen führen zu einer verstärkten Aktivität Neutrophiler Granulozyten. Interleukin 6 stimuliert T_H17-Zellen, während sie durch Interleukin 10 inhibiert werden (Fowler und Proctor, 2014). Skurnik *et al.* konnten zeigen, dass die Effektivität protektiver Antikörper gegen die kapsulären Polysaccharide CP5 und CP8 durch die in humanem Serum vorhandenen natürlichen Antikörper gegen Poly-N-Acetylglucosamin gehemmt wurde, was ein Grund für das Versagen CP-basierter Impfstoffe sein könnte (Skurnik *et al.*, 2012). Wenn man aufgrund dieser Feststellungen davon ausgeht, dass Antikörper die immunologische Abwehr von *S. aureus* nicht maßgeblich beeinflussen, muss folglich die Frage gestellt werden, ob eine Impfstoffentwicklung mit dem Ziel einer Antikörperinduktion überhaupt sinnvoll ist. Vielmehr erscheint dann die Auswahl der Antigene nach ihrem Potential der T-Zell-Induktion zielführend (Spellberg und Daum, 2012).

Diskutiert werden aber zahlreiche weitere mögliche Gründe für das Scheitern. Auch die Vielfalt und Redundanz unterschiedlicher Virulenzfaktoren mit jeweils spezifischer Bedeutung für einzelne Schritte des Infektionsgeschehens wird als bedeutend für die Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen *S. aureus* gesehen (Scully *et al.*, 2014). Während sich die ersten Ansätze auf eines bis wenige Antigene beschränkten, werden in der aktuellen Impfstoff-Entwicklung Multi-Antigen-Ansätze als zielführend betrachtet (Daum und Spellberg, 2012).

Darüber hinaus wird in Frage gestellt, ob Maus-Modelle zur Vorhersage der Effekte beim Menschen hinreichend geeignet sind. Der Etablierung alternativer Modell-Organismen wird deshalb große Bedeutung auf dem Weg zum Erfolg beigemessen (Salgado-Pabon und Schlievert, 2014). Salgado-Pabon und Schlievert gehen im selben Übersichtsartikel davon aus, dass auch der Fokus auf zellwandassoziierte Antigene problematisch ist. Im Gegensatz zu diesen konnten mit sezernierten Antigenen in geeigneten Tiermodellen bereits positive Ergebnisse erzielt werden (Salgado-Pabon und Schlievert, 2014).

Der Forschungsstand und die Diskussionslage kann im Rahmen dieses Kapitels nur ausschnittshaft und nicht in seiner umfassenden Tiefe dargestellt werden. Die aktuellen Diskussionsgegenstände sind jedoch Grundlage für ein vertieftes Verständnis der immunologischen und pathogenetischen Zusammenhänge von *S. aureus*-Infektionen

und damit wegweisend für den möglichen Erfolg einer künftigen Impfung. Solange diese jedoch nicht verfügbar ist, werden alternative Therapiestrategien weiter von immenser Bedeutung sein.

1.8.3 Anti-Virulenz-Strategie

Die Wirkung herkömmlicher Antibiotika basiert auf einer Inhibition bakterieller Faktoren, die für deren Überleben und Wachstum unabdingbar sind. Durch die bakterizide bzw. bakteriostatische Wirkung dieser antimikrobiellen Substanzen werden Mikroorganismen einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt. Dies begünstigt wiederum die schnelle Entstehung von Resistenzen (Clatworthy *et al.*, 2007).

Virulenzfaktoren als therapeutisches Ziel haben konzeptionell einen anderen Hintergrund: Deren Inhibition kommt einer „Entwaffnung“ des pathogenen Organismus gleich, ohne ihn dabei zu eliminieren oder im Wachstum zu hemmen. Der auf diese Weise verringerte Selektionsdruck soll mit geringeren Resistenzraten einhergehen (Clatworthy *et al.*, 2007, Allen *et al.*, 2014, Ruer *et al.*, 2015). Ruer *et al.* führen als weiten Vorteil an, dass durch den gezielten und selektiven Angriff auf Virulenzfaktoren die wirtseigene mikrobiologische Flora weniger in Mitleidenschaft gezogen wird, als bei einer konventionellen antibiotischen Therapie (Ruer *et al.*, 2015). In einem Maus-Modell konnten Cho *et al.* (2012) zeigen, dass bereits subtherapeutische Dosen an Antibiotika zu Veränderungen in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms führten. Damit verbunden waren signifikanten Änderungen im Stoffwechsel mit erhöhten Raten an Adipositas (Cho *et al.*, 2012).

Die Entwicklung erfolgreicher Anti-Virulenz-Strategien setzt ein profundes Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge im Infektionsgeschehen voraus. Ausgehend davon können wichtige Virulenz-vermittelnde Faktoren und Systeme als potentielle Ziele einer antimikrobiellen Therapie identifiziert werden. In dem Übersichtsartikel von Park und Liu (2012) wird der Forschungsstand zu aktuellen therapeutischen *Targets* für *S. aureus* zusammengefasst: Dazu gehören u. a. der Clumping Faktor A als wichtiges bakterielles Adhäsın, IsdA und IsdB, die eine ausreichende Eisenaufnahme sicherstellen, Staphyloxanthin, das Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Spezies bietet, *agr*, ein globaler Genregulator, über den die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren gesteuert wird sowie Toxine und weitere Proteine (Park und Liu, 2012).

Die Staphylokokken-Koagulasen Coa und vWbp sowie das Adhäsin *Clumping Factor A* (ClfA) vermitteln die Entstehung thromboembolischer Läsionen (McAdow *et al.*, 2011). In einem Maus-Sepsis-Modell konnten McAdow *et al.* zeigen, dass durch Kombination des direkten Thrombininhibitors Dabigatran mit spezifischen Antikörpern gegen ClfA die Agglutination verhindert und damit das Überleben von Mäusen verbessert werden konnte (McAdow *et al.*, 2011).

Ein vielversprechendes therapeutisches Ziel ist auch die Sortase A. Das Enzym verankert zellwandassoziierte Proteine (MSCRAMMs) kovalent im Peptidoglykan der bakteriellen Zellhülle. Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, zeigen im Maus-Modell eine deutlich reduzierte Virulenz (Mazmanian *et al.*, 2000). Sie sind nicht in der Lage Abszesse zu bilden und im Gewebe zu persistieren (Cheng *et al.*, 2009). Es sind bereits zahlreiche kleine organische Moleküle bekannt, die *in vitro* als Sortase-Inhibitoren wirken (Cascioferro *et al.*, 2015). Mit Triazolothiadiazolen-Derivaten konnten im Maus-Bakteriämie-Modell präventive Effekte gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2014).

Die aktuellen Ergebnisse deuten auf vielversprechende Möglichkeiten der Anti-Virulenz-Strategie hin.

1.9 Monoklonale Antikörper gegen *Staphylococcus aureus*

Monoklonale Antikörper gegen Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind nicht nur in Forschung und Diagnostik ein vielfältig einsetzbares Werkzeug. Der Rückzug großer Firmen aus der Entwicklung und Erforschung neuer Antibiotika (Cooper und Shlaes, 2011), verbunden mit dem zunehmenden Versagen konventioneller Therapiemethoden, lässt monoklonale Antikörper als potentielle therapeutische Option an Bedeutung gewinnen. Bis heute wurden bereits zahlreiche monoklonale Antikörper gegen verschiedene *S. aureus*-Virulenzfaktoren hergestellt und charakterisiert sowie hinsichtlich ihrer potentiellen klinischen Anwendungsmöglichkeiten evaluiert. Trotz zahlreicher Studien stehen aktuell noch keine Präparate für die klinische Anwendung zu Verfügung (Proctor, 2012).

Lorenz *et al.* konnten mit einem murinen IgG₁-Antikörper (UK-66P) gegen das *Immunodominant surface antigen A* (IsaA) in einem Maus-Infektionsmodell protektive Effekte bei Applikation subletaler und letaler Dosen von *S. aureus* nachweisen. *In vitro* führte mAk UK-66P zu einer Stimulation Neutrophiler Granulozyten mit der Folge einer

verstärkten Freisetzung reaktiver oxidativer Metabolite und einer erhöhten Elimination der Staphylokokken (Lorenz *et al.*, 2011)

2014 konnten für die humanisierten Form von mAk UK-66P (hUK-66P) vergleichbare Bindungseigenschaften nachgewiesen werden. hUK-66P zeigte in Vollblutproben eine erhöhte bakterielle Elimination. Diese Effekte waren sowohl in Proben gesunder Spender als auch in den Proben von Spendern mit prädisponierenden Faktoren für *S. aureus*-Infektionen, wie z. B. bei Diabetes- oder Dialyse-Patienten nachweisbar (Oesterreich *et al.*, 2014).

Konsistent mit den Ergebnissen von Lorenz *et al.* (2011) und Oesterreich *et al.* (2014) konnten van den Berg *et al.* (2015) mit dem voll-humanen α -IsaA-Antikörper 1D9 in einem Maus-Bakteriämie-Modell bei prophylaktischer Gabe protektive Effekte erzielen. Diese Wirkung war allerdings nur für ein MSSA-Isolat nachweisbar. Für den CA-MRSA-Stamm USA300 konnten protektive Effekte hingegen nicht nachgewiesen werden. Die therapeutische Anwendung war weder bei einer MSSA- noch bei einer MRSA-USA300-Bakteriämie wirksam (van den Berg *et al.*, 2015).

Der Protein-A-neutralisierende monoklonale Antikörper 3F6 konnte in einem Sepsis-Modell bei neonatalen Mäusen protektive Effekte erzielen (Thammavongsa *et al.*, 2015). Ein vielversprechender mAk konnte 2015 von Ohsawa *et al.* generiert werden. Aus einer Immunisierung mit deacetylierten Zellwänden von *S. aureus* wurde neben zahlreichen anderen mAks der IgG-Antikörper ZBIA5H selektiert. Dieser Antikörper zeigte trotz geringerer Affinität eine protektive Wirkung in einem Maus-Sepsis-Modell (Ohsawa *et al.*, 2015).

Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit waren gegen Proteine aus der SERAM-Gruppe (Coa, vWbp, Eap, Emp, Efb) keine monoklonalen Antikörper verfügbar. Nicht nur im Hinblick auf das Potential der SERAMs als therapeutische Angriffspunkte, sondern auch im Interesse der Aufklärung ihrer Bedeutung für die Pathogenese war eine Generierung vielseitig anwendbarer und spezifischer monoklonaler Antikörper sinnvoll und gerechtfertigt.

1.10 Ziele der Arbeit

SERAMs spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese Staphylokokken-bedingter Erkrankungen. Die Mechanismen ihrer Wirkung und die Bedeutung im Zusammenspiel mit weiteren Virulenzfaktoren sind jedoch noch unzureichend verstanden. Monoklonale Antikörper stellen durch die Möglichkeit der spezifischen Detektion ein ideales Werkzeug dar, um genauere Untersuchungen zu Sekretion und Lokalisation der entsprechenden Proteine durchzuführen. Darüber hinaus können mit den spezifischen mAKs vergleichende Analysen verschiedener klinischer *S. aureus*-Isolate durchgeführt werden und diese hinsichtlich ihres Sekretionsverhaltens charakterisiert werden. Die Anwendung kann dabei im besten Fall sowohl im *Immunoblot*, als auch im 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) immunfluoreszenzmikroskopisch erfolgen. Das 3D-CoG/FP eignet sich aufgrund der plastischen Darstellung des Staphylokokken-Wachstums nicht nur zur Analyse des zeitlichen Sekretionsverhaltens. Die immunfluoreszenzmikroskopische Färbung mit dafür geeigneten monoklonalen Antikörpern lässt auch eine detaillierte Lokalisierung und Detektion entsprechender Proteine in Bezug zu distinkten Strukturen der Staphylokokken-Mikrokolonien zu (Guggenberger *et al.*, 2012). Das Modell eignet sich zur Darstellung und Simulierung spezifischer Strukturen und Teilaspekte der Pathogenese von Weichteilabszessen. Die damit bereits mögliche morphologische Charakterisierung verschiedener *S. aureus*-Stämme wird durch die immunfluoreszenzmikroskopische Beurteilung spezifischer Exoprotein-Profile und deren mögliche Involvierung in die Pathogenese erweitert.

Ziel der Arbeit ist die Generierung und Etablierung muriner monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Proteine (SERAMs) des Methicillin-sensiblen Stammes *Staphylococcus aureus* Newman. Die Antikörper sollen anschließend charakterisiert und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit im *Immunoblot* und in dem von Guggenberger *et al.* (2012) für *S. aureus* etablierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) evaluiert werden. Geeignete Antikörper sollen zur Charakterisierung des Exoprotein-Profiles verschiedener klinischer MSSA- und MRSA-Isolate sowohl im *Immunoblot* als auch immunfluoreszenzmikroskopisch im 3D-CoG/FP angewendet werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollen die zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen zu verwendenden Antigene rekombinant hergestellt und aufgereinigt sowie durch TCA-Fällung aus dem Überstand bakterieller RPMI-Flüssigkulturen gewonnen werden.

Durch intraperitoneale Applikation der so gewonnenen Antigene wird das Immunsystem der BALB/c-Mäuse zur Bildung spezifischer Antikörper angeregt. Die nach der Immunisierungsphase aus der Milz gewonnen Antikörper-produzierenden Lymphozyten sollen im Anschluss daran mit Myelomzellen fusioniert und die so entstehenden Hybridomazell-Klone nach einem Selektionsprozess gezielt auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet werden. Geeignete Klone sollen nach einer Expansionsphase vereinzelt auf die Stabilität ihrer Antikörper-Produktion geprüft werden. Wie oben beschrieben, sollen geeignete Antikörper für weitere vergleichenden Analysen im *Immunoblot* sowie zur immunfluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung verschiedener MSSA- und MRSA-Isolate im 3D-CoG/FP angewendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Quelle/Firma
Blutagarplatten	Oxoid, Wesel
Chromatographie Säulen (Poly-Prep®)	Bio-Rad, München
Dialyse-System (D-Tube™ Dialyzer, Midi)	Merck Millipore, Darmstadt
Einfrierröhrchen (CryoPure, 1,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Küvetten, 1,5 ml halbmikro	Brand, Wertheim
Einmalspritzen, Braun Injekt®, 10, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Elektroporations-Küvetten (0,2 cm)	Bio-Rad, München
Filterpapier (Whatman™ 3MM Chr Chromatography Paper)	Whatman, Dassel
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Nitrocellulose Blotmembran, Amersham Protean 0,2	GE Healthcare, Freiburg
pH-Indikatorpapier (pH 5,5 – 9,0)	Merck Millipore, Darmstadt
Pipetten CELLSTAR® 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße CELLSTAR® 15, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Steilfilter, Millex GP 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	TPP, Trasadingen
Zellkulturschalen (60,1 cm ²)	TPP, Trasadingen
Zellkulturtestplatten 6, 24 und 96F	TPP, Trasadingen
µ-Slide 8 Well	Ibidi, München

2.2 Chemikalien, Biochemikalien und Medien

Chemikalie/Biochemikalie/Medium	Quelle/Firma
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BCIP	Biomol, Hamburg
Bovines Kollagen Typ I (3 mg/ml), PureCol	Advanced Biomatrix, Carlsbad
BugBuster® Master Mix	Merck Millipore, Darmstadt
Coomassie® Brillantblau R 250	Merck, Darmstadt
DAPI	Life Technologies, Carlsbad
DMEM	Life Technologies, Carlsbad
EDTA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Fetales Kälberserum (FBS)	Life Technologies, Carlsbad
Fibrinogen aus humanem Plasma	Merck Millipore, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	MP Biomedicals, Eschwege
HEPES Pufferlösung (1 M, 50 x)	Merck Millipore, Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich, Hamburg
IPTG	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaninchenserum	Chirurgische Forschung, Großhadern
Kollagen (Bovines Kollagen; 3 mg/ml)	Advanced Biomatrix, San Diego
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies, Carlsbad
LB-Agar	Roth, Karlsruhe

MATERIAL UND METHODEN

Lektin von <i>Triticum vulgaris</i> (FITC-Lektin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
MEM (10 x)	Life Technologies, Carlsbad
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Life Technologies, Carlsbad
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technologies, Carlsbad
pH-Indikatorpapier (pH 5,5 – 9,0)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 4000 (PEG 4000)	Merck Millipore, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Hamburg
Prothrombin aus humanem Plasma	Merck Millipore, Darmstadt
RNase A	Sigma-Aldrich, Hamburg
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad
Salzsäure (HCl), 37 %	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Biomol, Hamburg
Trichloressigsäure (TCA) 100 %	Roth, Karlsruhe
TRIS, ULTRA PURE	MP Biomedicals, Eschwege
Trypton-Soja-Agar	Roth, Karlsruhe
<i>Tryptone Soya Broth</i> (TSB)	Oxoid, Wesel
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid (ZnCl_2)	Sigma-Aldrich, Hamburg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg

2.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen dargestellt.

10 x TBS	TRIS	60,5 g (50 mM)
	NaCl	87,6 g (150 mM)
	H ₂ O	ad 1 l
	pH	7,5
1 x TBS-T	10 x TBS	200 ml
	H ₂ O _{dest.}	1798 ml
	Tween 20	2 ml
50 x TAE-Puffer	TRIS	242 g
	Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
10 x Laufpuffer (SDS-PAGE)	SDS	10 g
	TRIS	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
10 x <i>Blotting</i>-Puffer	TRIS	60,6 g
	Glycin	138,2 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 2 l
<i>Blotting</i>-Puffer	10 x <i>Blotting</i> -Puffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

MATERIAL UND METHODEN

2 x SDS-PAGE-Probenpuffer	TRIS (1,5 M, pH 6,8)	10 ml
	20 % SDS (w/v)	6 ml
	Glycerol	30 ml
	β -Mercaptoethanol	15 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Glycin-Puffer	Glycin	7,51 g
	MgCl ₂	203 mg (1 mM)
	ZnCl ₂	136 mg (1 mM)
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l
	pH	10,4

2.4 Medien

Im Folgenden werden Herstellung und Zusammensetzung der für die Zell- und Bakterienkultur verwendeten Medien dargestellt. Unter unsterilen Bedingungen hergestellte Medien wurden vor Verwendung bei 121 °C, 1 bar für 20 min autoklaviert.

2.4.1 Medien für die Zellkultur

Zellkulturmedium	Opti-MEM® Medium	500 ml
	FBS	50 ml
	Glutamin (200 mM)	5 ml
	(Penicillin-Streptomycin	5 ml)

Einfriermedium	FBS	45 ml
	DMSO	5 ml

2.4.2 Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium	Trypton	10g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

TSB-Medium	TSB	12 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 400 ml

MATERIAL UND METHODEN

SOC-Medium	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl	250 mM
	Glucose	20 mM

2.5 Verwendete Bakterienstämme

In folgenden Tabellen sind die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete MSSA-Stämme

Stamm	Referenz/Literatur/Quelle
<i>S. aureus</i> Newman	(Duthie und Lorenz, 1952)
<i>S. aureus</i> Newman <i>coa</i> (Δ coa::tet)	(McDevitt <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. aureus</i> Newman <i>vwbp emp</i> (Δ emp::erm)	(Johnson <i>et al.</i> , 2008)

Tabelle 2.2: Verwendete MRSA-Referenzstämme (NRZ Wernigerode)

Stamm	Quelle
Rheinhessen (MRSA-RH)	NRZ, Wernigerode
Barnim (MRSA-BAR)	NRZ, Wernigerode
Norddeutschland (MRSA-ND)	NRZ, Wernigerode
Süddeutschland (MRSA-SD)	NRZ, Wernigerode
Klonale Gruppe III (MRSA-KG)	NRZ, Wernigerode
Berlin (MRSA-BER)	NRZ, Wernigerode
Köln (MRSA-KLN)	NRZ, Wernigerode
Wien (MRSA-WI)	NRZ, Wernigerode
Spanien (MRSA-SP)	NRZ, Wernigerode
Dänemark (MRSA-DM)	NRZ, Wernigerode
Großbritannien (MRSA-GB)	NRZ, Wernigerode

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.3: Weitere verwendete klinische MRSA-Stämme

Stamm	Referenz/Literatur
SP1 (Sputum-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
SP2 (Sputum-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
BK1 (Blutkultur-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
BK2 (Blutkultur-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
WU1 (Wundabstrich)	Klinikum Großhadern, München
WU2 (Wundabstrich)	Klinikum Großhadern, München

Tabelle 2.4: Verwendete klinische MSSA-Stämme

Stamm	Referenz/Literatur
SP1/2 (Sputum-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
SP2/2 (Sputum-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
BK3/2 (Blutkultur-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
BK4/2 (Blutkultur-Isolat)	Klinikum Großhadern, München
WU1/2 (Wundisolat)	Klinikum Großhadern, München
WU2/2 (Wundisolat)	Klinikum Großhadern, München
WU3/2 (Wundisolat)	Klinikum Großhadern, München
WU4/2 (Wundisolat)	Klinikum Großhadern, München
WU5/2 (Wundisolat)	Klinikum Großhadern, München
Klinisches Isolat MSSA MP-3	Klinikum Großhadern, München
Klinisches Isolat MSSA MP-5	Klinikum Großhadern, München
Klinisches Isolat MSSA MP-6	Klinikum Großhadern, München
Klinisches Isolat MSSA MP-9	Klinikum Großhadern, München

Tabelle 2.5: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Referenz/Literatur
<i>E. coli</i> DH-5 α	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	(Studier und Moffatt, 1986)

2.6 Zelllinien

In der Arbeit wurde die in folgender Tabelle aufgeführte Zelllinie zur Herstellung der monoklonalen Antikörper verwendet.

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Stammnummer	Quelle
P3-X63-Ag8.653	ATCC-TIB-132	DSMZ, Braunschweig

2.7 Mauslinien

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden weibliche, 12 Wochen alte BALB/c-Mäuse verwendet.

2.8 Antibiotika

Zur Selektion von Bakterien auf Agarplatten und in Flüssigkultur wurden Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml (Stock: 5 mg/ml) und Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (Stock: 100 mg/ml) verwendet.

2.9 Enzyme

In Tabelle 2.7 sind die in der Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 2.7: Verwendete Enzyme

Enzym	Quelle
DNA-Polymerase (<i>Expand High Fidelity</i>)	Roche, Basel
DNA-Polymerase (<i>DreamTaq</i>)	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzym BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzym Sall	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.10 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung der rekombinanten Proteine wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert (vgl. Tabelle 2.8) und in einem vom Hersteller angegebenen Volumen H₂O_{dest.} auf je 100 pmol/µl verdünnt.

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid (Bezeichnung)	Sequenz (5' – 3')
Coa_for_BamHI_2	AATGGATCCATAGAAGGCAGAAATAGTAACAAAGGATTATAGTGGG
Coa_rev_SalI_2	AATGTCGACTTATTTTGTACTCTAGGCCC
vWbp_BamHI_factorXa_F	GAAAGGATCCATAGAAGGCAGAGTGGTTTCTGGGGAGAAGAATC
vWbp_SalI_R	GAAGTCGACGCAGCCATGCATTAATTATTTGCC
Emp_BamHI_factorXa_F	GAAAGGATCCATAGAAGGCAGATCAGTGACAGAGAGTGTTGACAAA
Emp_SalI_R	GAAGTCGACAGTGCCAATTTTATACTCG
Fib_for_BamHI	AATGGATCCAGCGAAGGATACGGTCCAAG
Fib_rev_SalI	AGGTCGACCCAGATAACAGCAACGATTG
Map_for_BamHI	ACCGGATCCGCAGCTAAGCCATTAGATAAATC
Map_rev_SalI	AGGTCGACACTGGGAATTCACATTATTAG
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
pET-UP	ATGCGTCCGGCGTAGA

GGATCC: Schnittstelle für BamHI

GTCGAC: Schnittstelle für SalI

ATAGAAGGCAGA: Faktor Xa-Schnittstelle

2.11 Plasmide

Zur Klonierung und Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine wurden die in Tabelle 2.9 aufgeführten Vektoren verwendet.

Tabelle 2.9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz/Quelle
pET-28a	Merck Millipore, Darmstadt
pCR®2.1TOPO	Life Technologies, Carlsbad
pSC-A-amp/kan	Agilent Technologies, Santa Clara
pET-28a_coa	Diese Arbeit
pET-28a_vwbp	Diese Arbeit
pET-28a_emp	Diese Arbeit
pET-28a_efb	Diese Arbeit
pET-28a_eap	Diese Arbeit

2.12 Antikörper

Für die in dieser Arbeit durchgeführten immunfluoreszenzmikroskopischen Färbungen und die Entwicklung der *Immunoblots* wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet.

2.12.1 Primäre Antikörper

Als primäre Antikörper wurden die in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Maus-Antikörper verwendet.

2.12.2 Sekundäre Antikörper

In Tabelle 2.10 sind die in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper aufgeführt.

Tabelle 2.10: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Firma/Quelle
α -Maus IgG	HRP	Ziege	1:5000	Sigma-Aldrich, Hamburg
α -Maus IgG/IgM	Alkalische Phosphatase	Ziege	1:2500	Dianova, Hamburg
α -Maus IgG	Cy3	Ziege	1:100	Sigma-Aldrich, Hamburg

2.13 Molekularbiologische Fertigprodukte (*Kits*)

In Tabelle 2.11 sind die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen *Kits* aufgeführt.

Tabelle 2.11: Verwendete Molekularbiologische *Kits*

Kit (Bezeichnung)	Anwendung	Quelle/Firma
Bio-Rad Protein Assay	Proteinmengenbestimmung	Bio-Rad, München
BioMix™	PCR-Screening von Kolonien	Bioline, London
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Aufreinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion von DNA-Fragmenten	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Aufreinigung von DNA-Plasmiden	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ Rapid Antibody Isotyping Kit - Mouse	Isotypisierung der monoklonalen Antikörper	Life Technologies, Carlsbad

MATERIAL UND METHODEN

PrestoSpin D Bug	Aufreinigung chromosomaler DNA	Molzym, Bremen
StrataClone™ PCR Cloning Kit	Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pSC-A-amp/kan (Zwischenvektor)	Agilent Technologies, Santa Clara
TOPO TA Cloning® Kit	Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR®2.1-TOPO® (Zwischenvektor)	Life Technologies, Carlsbad

2.14 Geräte und Software

In Tabelle 2.12 sind die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.12: Verwendete Geräte

Gerät	Modell/Bezeichnung	Firma
Agarose-Gelelektrophorese-System	PerfectBlue Gelsystem Mini S und Mini L	Peqlab, Erlangen
Brutschrank	Typ B 20	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Brutschrank	Typ BBD 6220	Heraeus, Hanau
Detektionssystem für Agarose-Gele	Gel Doc™ XR System	Bio-Rad, München
Detektionssystem für <i>Immunoblots</i>	ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad, München
Einfriersystem zur Kryokonservierung von Zellen	CoolCell® LX	Biocision, San Rafael
Elektroporationsgerät	MicroPulser™	Bio-Rad, München
Feinwaage	Type 1801	Sartorius, Göttingen
Grobwaage	PCB 2500-2	Kern, Balingen
Grobwaage	1203 MP	Sartorius, Göttingen
Inkubationsschüttler	Multitron pro	Infors HT, Balingen
Konfokales Laser-Mikroskop	SP5 confocal	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer/Heizplatte	RET basic C	IKA, Staufen
Miniblotter	MN 16	Biometra, Göttingen

MATERIAL UND METHODEN

Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved 0,1 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Cycler	Uno Cycler	VWR, Darmstadt
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Greifensee
Pipetten	PIPETMAN P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie® 2	VWR, Darmstadt
Rollenmischer	RM5 Assistent 348	Karl Hecht, Sondheim
SDS-PAGE-System	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Ultrospec™ 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Strom-/Spannungsquelle	Bio-Rad Powerpac 1000 Power Supply	Bio-Rad, München
Transilluminator	UVT-20M/W	Herolab, Wiesloch
Ultraschallapplikator	Sonifier 250	Branson, St. Louis
Wasserbad	Memmert WB14	Memmert, Büchenbach
<i>Western Blot</i> -System	Mini Trans-Blot System	Bio-Rad, München
Wippschüttler	Duomax 1030	Heidolph, Kelheim
Zentrifuge	3K30	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge	3-30K	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

Tabelle 2.13: Verwendete Software

Software	Anwendung	Firma/Entwickler
Image Lab™	Immunoblot-Dokumentation	Bio-Rad, München
Office	Textverarbeitung/ Bildbearbeitung	Microsoft, Redmond
LAS AF	SP5, Bildverarbeitung	Leica, Wetzlar
Gel Doc	Agarose-Gel-Dokumentation	Bio-Rad, München
CLC main workbench	DNA-Sequenzanalyse	CLC bio, Aarhus

2.15 Mikrobiologische Methoden

2.15.1 Kultivierung in Flüssigmedien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in den in Abschnitt 2.4.2 aufgeführten bakteriellen Kulturmedien. Entsprechende Volumina (z. B. 5 ml Medium für eine Übernachtskultur) wurden in Glasröhrchen vorgelegt und optional mit Antibiotika supplementiert (50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin). Zur Inokulation des Mediums wurde eine Bakterien-Kolonie von einem Festmedium entnommen und mit einer Pipettenspitze in das Medium überführt. Größere Volumina wurden in entsprechenden Verhältnissen (z. B. 1:40) aus bakteriellen Übernachtskulturen inokuliert.

2.15.2 Kultivierung auf Festmedien

Zur Kultivierung der *S. aureus*-Stämme wurden Blutagarplatten von Oxoid (Wesel) verwendet. Nach einer Vereinzellung durch Dreiösenausstrich folgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Alle übrigen Bakterien-Stämme (*E. coli*) wurden auf LB-Agar (40 g/l) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Optional wurden Antibiotika in der in Abschnitt 2.8 angegebenen Weise zugesetzt.

2.16 Proteinbiochemische Methoden

2.16.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld (Laemmli, 1970).

In einem diskontinuierlichen Verfahren werden die zuvor in SDS-Probenpuffer denaturierten Proteine zunächst in einem Sammelgel (5 % Acrylamid) in einer Bande konzentriert, um anschließend im Trenngel in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse und der Porengröße des Gels (8 – 15 % Acrylamid) getrennt zu werden.

Zur Herstellung der SDS-Gele wurde das System von Bio-Rad (München) verwendet (vgl. Tabelle 2.12). Zwischen zwei Glasplatten (Abstand 0,75 mm oder 1,0 mm) wurde zunächst das Trenngel gegossen und bis zur Auspolymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach Zugabe des Sammelgels wurde durch Einlage von Kämmen (1, 10 oder 15 Zähne) eine entsprechende Anzahl an Taschen zur Beladung des Gels mit dem Größenstandard und den Proteinproben geschaffen.

Die Proteinproben wurden zunächst im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C solubilisiert. Die Anlagerung des negativ geladenen SDS führt zu einer proportional zum Molekulargewicht zunehmenden negativen Ladung der Proteine. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden in einem mit Laufpuffer gefüllten Tank platziert und mit den Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter folgenden Bedingungen: 70 V für 20 min und direkt im Anschluss 150 V für 1 - 1,5 h bis die Laufront knapp vor dem unteren Gelrand angekommen war. In Tabelle 2.14 und Tabelle 2.15 sind die Zusammensetzungen der SDS-Polyacrylamid-Gele aufgeführt. Die Volumina sind in ml angegeben. Das Gesamtvolumen pro Gel betrug jeweils 5 ml und für das Sammelgel (5 %) 1 ml.

Tabelle 2.14: SDS-Polyacrylamid-Gele (Trenngele)

Komponenten (ml)	8 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O _{dest.}	2,3	1,9	1,6	1,1
30 % Acrylamid*	1,3	1,7	2,0	2,5
1,5 M TRIS pH 8,8	1,3	1,3	1,3	1,3
10 % SDS	0,05	0,05	0,05	0,05
10 % APS	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002	0,002

*Acrylamid: Bis-Acrylamid = 29:1

Tabelle 2.15: Sammelgel (5 %)

Komponenten (ml)	Volumen (ml)
H ₂ O	0,68
30 % Acrylamid*	0,17
1,5 M TRIS pH 6,8	0,13
10 % SDS	0,01
10 % APS	0,01
TEMED	0,001

*Acrylamid: Bis-Acrylamid = 29:1

2.16.2 Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969)

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Coomassie-Färbung angewendet (Weber und Osborn, 1969). Nach vorsichtiger Lösung der Gele von der Glasplatte und Abtrennung und Verwerfen des Sammelgels wurden diese für ca. 30 min auf dem Wippschüttler bei RT in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Entfärbung in der entsprechenden Entfärbelösung bis die Proteinbanden in ausreichendem Kontrast sichtbar waren.

Coomassie-Färbelösung:	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	500 ml
	Coomassie Brillant Blau R250	1 g

Entfärbelösung:	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	500 ml

2.16.3 *Western Blot*

Das *Western Blotting* stellt eine Methode zur Übertragung von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Membran (z. B. Nitrocellulose) dar (Towbin *et al.*, 1979).

2.16.3.1 Herstellung der *Western Blots*

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der *Western Blots* das „Mini Trans Blot-System“ von Bio-Rad (München) verwendet. In der Gel-Haltebox wurden von der Kathode in Richtung Anode folgende Elemente übereinander geschichtet:

- Faser-Pad
- Filterpapier (Whatman)
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- Nitrocellulosemembran (Whatman)
- Filterpapier (Whatman)
- Faser-Pad

Die Gel-Halteinrichtung wurde in das Elektroden-Modul eingebracht (maximal zwei Gele pro Modul) und diese wiederum in einem mit *Blotting*-Puffer gefüllten Tank platziert. Ein zusätzlich im Tank vorhandenes Eis-Modul (mit gefrorenem H₂O) stellte dabei eine kontinuierliche Kühlung während des *Blottens* sicher. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde bei konstant 200 mA für 1 h durchgeführt. Falls sich nur ein Gel im Tank befand wurde bei 170 mA für 45 min geblottet.

2.16.3.2 Ponceau-Färbung

Zur Detektion von Proteinbanden auf Nitrocellulosemembranen (*Western Blots*) wurde die Färbung mit Ponceau S angewendet (Salinovich und Montelaro, 1986). Da diese reversibel ist, bleiben nachfolgende Reaktionen mit Antikörpern unbeeinträchtigt. Die Nitrocellulosemembranen wurden direkt nach dem *Blotten* für 2 min in der Ponceau S-Lösung geschwenkt. Nach Abnehmen der Lösung wurde mit H₂O_{dest.} gewaschen bis die Proteinbanden in ausreichendem Kontrast sichtbar waren.

Ponceau S-Färbelösung	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	TCA	3 % (v/v)

2.16.3.3 Blockieren der *Western Blots*

Falls nach dem Transfer keine Färbung mit Ponceau S erfolgte wurden die Membranen unmittelbar in Blockier-Lösung (1,5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T) für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Dadurch werden bei anschließenden Färbungen unspezifische Antikörperreaktionen minimiert.

Blockier-Lösung (1,5 % w/v)	Milchpulver	4,5 g
	TBS-T	300 ml

2.16.3.4 Färbung und Entwicklung der *Western Blots (Immunoblots)*

Die *Western Blots* wurden nach dem Blockieren für 1 – 1,5 h mit unverdünntem (soweit nicht anders angegeben) Zellkulturüberstand der Hybridomazellklone auf einem Wippschüttler oder Rollenmischer bei RT inkubiert. Um überschüssige ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen im Anschluss daran 3 x 5 Minuten unter Schwenken bzw. Rollen in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 45 min bis 1 h bei RT unter Schwenken bzw. Rollen (vgl. Tabelle 2.10). Nach drei weiteren fünf-minütigen Waschschritten in TBS-T erfolgte die Entwicklung der *Western Blots (Immunoblots)*. Zur Detektion von HRP-konjugierten Antikörpern wurde das „Amersham ECL Western Blotting Detection Kit“ von GE Healthcare (Sulingen) verwendet. Grundlage dieser Detektionsmethode ist eine durch Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol. Das im Zuge dieser Reaktion emittierte Licht mit einem Maximum bei 428 nm wird in Anwesenheit von Phenolen verstärkt und kann daraufhin detektiert werden (Herstellerangaben). Zur Bildaufnahme wurde das „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München) verwendet. Die Detektionslösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf dem *Blot* verteilt (insgesamt 2 ml pro *Blot*). Nach zweiminütiger Inkubation bei RT erfolgte unmittelbar die Detektion im „ChemiDoc™ MP Imaging System“ (Bio-Rad, München). Eine weitere Methode zur Visualisierung von proteingebundenen Antikörpern stellt die Umsetzung von BCIP durch Antikörper-konjugierte Alkalische Phosphatase (AP) dar (Knecht und Dimond, 1984). BCIP wird dabei zu 5-Bromo-4-chloroindoyl und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Unter Einwirkung von atmosphärischem Sauerstoff kommt es durch Oxidation und Dimerisierung zur Bildung

des blauen Farbstoffes 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo (McGadey, 1970). Bei Anwendung von AP-konjugierten Antikörpern (vgl. Tabelle 2.10) wurden die Membranen nach dem letzten Waschgang mit TBS-T kurz in Glycin-Puffer (pH 11) geschwenkt, um bereits vor Zugabe von BCIP das für die Reaktion nötige alkalische Milieu zu schaffen. Zur Entwicklung wurden die *Western Blots (Immunoblots)* für 10 bis 20 min in Glycin-Puffer mit 0,5 - 1 mg/ml BCIP bei RT geschwenkt bzw. gerollt. Die *Blots* wurden anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und getrocknet.

2.16.3.5 Anti-His-Blot

Die *Blots* wurden wie in Abschnitt 2.16.3.1 beschreiben hergestellt. Blockiert wurde im Unterschied zur üblichen Vorgehensweise in PBS mit 0,1 % Tween (v/v) und 0,1 % Triton (v/v) über Nacht bei 4 °C. Die Membranen wurden mit dem Primärantikörper (α -His, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 2 h bei RT inkubiert. Darauf wurde 3 x 5 min mit Blockierlösung gewaschen. Das weitere Vorgehen ist in Abschnitt 2.16.3.4 dargestellt. Als Sekundärantikörper wurde α -Maus IgG (HRP-konjugiert) verwendet (Verdünnung: 1:10000, vgl. Tabelle 2.10). Zur Entwicklung wurde das „Amersham ECL Western Blotting Detection Kit“ von GE Healthcare (Solingen) verwendet. Die Visualisierung erfolgte auf Röntgenfilmen (Typ SuperRX, Fujifilm).

2.16.4 TCA-Fällung von Kulturüberstandsproteinen

Proteine aus bakteriellem Flüssigkulturüberstand können mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und damit aufkonzentriert und aufgereinigt werden. Zur Generierung von *S. aureus*-Kulturüberstandsproteinen wurde RPMI 1640 Medium 1:20 bzw. 1:50 aus einer *S. aureus*-Übernachtkultur (in TSB-Medium) angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,6 - 1,0$ (exponentielle Phase) oder über Nacht (stationäre Phase) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation der Flüssigkultur bei 1960 g und 4 °C für 20 min wurde der Überstand sterilfiltriert. Zu 6 x 45 ml des Überstandes wurden je 5 ml TCA (100 %) gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation der präzipitierten Proteine bei 11000 g und 4 °C für 30 min. Die Protein-Sedimente wurden in 30 ml eigekühltem Aceton für 20 min auf Eis gewaschen, woraufhin ein erneuter Zentrifugations-Schritt bei 11000 g und 4 °C für 20 min erfolgte. Nach einem weiteren Waschschrift in 30 ml Aceton und einem unmittelbar darauf folgenden Zentrifugations-Schritt (11 000 g, 4 °C, 20 min) wurden die Sedimente in 500 μl TRIS-Puffer (500 mM, pH 7,4) resuspendiert und bei – 20 °C gelagert.

2.16.5 Extraktion zellwandassoziierter Proteine von *S. aureus*

Zellwandassoziierte Proteine von *Staphylococcus aureus* können mit einem Puffer auf SDS-Basis extrahiert werden (Hussain *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde das Protokoll von Hussain *et al.* mit einigen Modifikationen angewendet. Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente von *S. aureus* wurden in 4 µl SDS-Extraktionspuffer pro mg Sediment resuspendiert und anschließend 5 min bei 95 °C und 650 rpm aufgekocht. Die Zellsuspension wurde im Anschluss daran für 10 sec „gevortext“ und danach für 5 min bei 11000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden bei – 20 °C gelagert.

2.16.6 Proteinmengenbestimmung

Zur Quantifizierung von Proteinmengen wurde die Methode nach Bradford angewendet (Bradford, 1976). Dabei wird die Extinktion des proteingebundenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau R250 bei 595 nm spektralphotometrisch bestimmt und mit einer Proteinstandardkurve aus BSA (Albumin Fraktion V, Roth) verglichen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *Kit* von Bio-Rad (München) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.17 Molekulargenetische und analytische Methoden

2.17.1 Aufreinigung chromosomaler DNA (*S. aureus*)

Zur Aufreinigung chromosomaler DNA von *Staphylococcus aureus* wurde das *Kit* „PrestoSpin D Bug von Molzym verwendet (vgl. Tabelle 2.11). Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.17.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht eine effiziente und schnelle Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987). Grundlage ist eine in Zyklen ablaufende Vervielfältigung der DNA, woraus ein exponentieller Anstieg der synthetisierten DNA-Menge resultiert. Nach einer initialen Auftrennung der DNA-Doppelhelix in ihre beiden Einzelstränge beginnt ein Zyklus mit dem „Aufschmelzen“ (Denaturierung) des DNA-Doppelstranges bei 95 °C. In der darauf folgenden *Annealing*-Phase können zwei Oligonukleotide (*Primer*, vgl. Tabelle 2.8) bei einem für sie jeweils spezifischen Temperatur-Optimum an die komplementären Stellen in der DNA-Matrize

MATERIAL UND METHODEN

(*Template*) binden und damit Anfang und Ende des gewünschten DNA-Fragmentes definieren. Die *Primer* dienen als Startpunkt für eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase, vgl. Tabelle 2.7), die in der folgenden Elongationsphase das entsprechende Fragment bei 72 °C synthetisiert. Im Anschluss daran beginnt ein neuer Zyklus. Nach Ablauf von ca. 35 – 40 Zyklen wird die Vervielfältigung in einer letzten Elongationsphase (72 °C) beendet. In Tabelle 2.16 sind die Variablen des PCR-Reaktionsprogramms dargestellt.

Tabelle 2.17 führt die Zusammensetzungen der einzelnen Reaktionsansätze auf.

Tabelle 2.16: PCR-Reaktionsprogramm

Schritte	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Zyklen (x)
Initiale Denaturierung	180	95	1
Denaturierung	20	95	35 - 40
<i>Annealing</i>	30	58	
Elongation	75	72	
Finale Elongation	480	72	1
Lagerung	∞	4	1

Tabelle 2.17: PCR-Reaktionsansätze (50 µl)

High Fidelity, Roche

Komponenten	Volumen (µl)
Polymerase (3,5 U/µl)	0,5
<i>Primer</i> 1 (100 pmol/µl)	2
<i>Primer</i> 2 (100 pmol/µl)	2
<i>Template</i> (chromosomale DNA)	0,5
dNTP <i>Mix</i> (je 10 mM)	1
Reaktionspuffer (5 x)	10
H ₂ O _{dest.}	34

DreamTaq, Fermentas

Komponenten	Volumen (µl)
Polymerase (5 U/µl)	0,5
<i>Primer</i> 1 (100 pmol/µl)	2
<i>Primer</i> 2 (100 pmol/µl)	2
<i>Template</i> (chromosomale DNA)	1
dNTP <i>Mix</i> (je 2 mM)	5
Reaktionspuffer (10 x)	5
H ₂ O _{dest.}	34,5

Für das *Screening* von Kolonien auf das Vorhandensein bestimmter Gene wurde ein PCR-Fertig-Mix („BioMix™“, Bioline) verwendet. Außer *Primer* und *Template* enthält dieser bereits alle für die PCR benötigten Komponenten. Die Kolonien wurden in 25 µl-Ansätzen getestet (vgl. Tabelle 2.18). Pro Ansatz wurde eine Kolonie als *Template* eingesetzt.

Tabelle 2.18: Screening-PCR (25 µl)

Komponenten	Volumen (µl)
BioMix™	12,5
Primer 1 (100 pmol/µl)	1
Primer 2 (100 pmol/µl)	1
H ₂ O _{dest.}	10,5
Kolonie	-

2.17.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden vor weiterer Verwendung aufgereinigt. Dazu wurde das *Kit* „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ verwendet und entsprechend den Herstellerangaben verfahren (vgl. 2.13).

2.17.4 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarose-Gel können DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. In der Arbeit wurde dazu das System von Peqlab („PerfectBlue Gelsystem Mini S und Mini L“, vgl. Tabelle 2.12) verwendet. Die 1 % Agarose-Gele wurden wie folgt hergestellt: 1 g Agarose-Pulver wurde zu 100 ml 1 x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Anschließend wurde die Lösung in eine Gel-Haltevorrichtung gegossen. Durch Einlage eines Kammes wurden Taschen zur Aufnahme der DNA-Proben geschaffen. Vor Auftragung wurden die Proben mit „Orange DNA Loading Dye“ (6X) (Fermentas) gemischt. Als Größenstandard wurde „GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“ (Fermentas) verwendet. Die Trennung erfolgte bei konstant 90 V für 45 min. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Agarose-Gele für 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (Konzentration: 1 µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und RNA-Moleküle und wird dadurch zu einem fluoreszierenden Farbstoff bei Anregung durch ultraviolettes Licht. Dadurch können im Agarose-Gel spezifisch Nukleinsäuren detektiert werden (Herstellerangaben).

2.17.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Kompetenz ist die Fähigkeit einer Zelle freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Griffith, 1928, Avery *et al.*, 1944). Dabei wird zwischen natürlicher und künstlicher Kompetenz unterschieden. Letztere kann bei spezieller Vorbehandlung und unter

bestimmten Umständen dazu verwendet werden, Zellen mit Plasmiden zu transformieren.

2.17.5.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (Dower *et al.*, 1988)

500 ml LB-Medium wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit 5 ml einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 (nach ca. 3 h erreicht) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und in 50 ml-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 5000 rpm (2599 g) und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente aus je 50 ml Kultur in je 20 ml eisgekühltem H₂O_{dest.} resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen. Die Zellsedimente wurden nun in je 10 ml H₂O_{dest.} aufgenommen und vor erneuter Zentrifugation in zwei 50 ml-Reaktionsgefäßen zusammengeführt. Nach diesem Schritt wurden die Zellen in je 5 ml 10 % Glycerol (v/v) resuspendiert, in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte die Aufnahme in 2 ml 10 % Glycerol (v/v) und Aliquotierung zu je 50 μ l und 100 μ l. Die Aliquots wurden auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei – 80 °C gelagert.

2.17.5.2 Herstellung calciumkompetenter *E.coli* (Hanahan, 1983)

500 ml LB-Medium wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit 5 ml einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min in 50 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Die Zellen wurden in 15 ml eisgekühltem Puffer TFB1 pro 50 ml Kultur resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Sedimente in 2 ml eigeekühltem Puffer TFB2 pro 50 ml Ausgangskultur aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 50 und 100 μ l aliquotiert und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C.

Puffer TFB1	KAc (1 M)	6 ml
	MnCl ₂ (1 M)	10 ml
	RbCl (1 M)	20 ml
	CaCl ₂ (1 M)	2 ml
	Glycerin (87 %)	34,5 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 200 ml

Der pH wurde mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt und der Puffer nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.

Puffer TFB2	Mops (1 M, pH 7,0)	1 ml
	CaCl ₂ (1M)	7,5 ml
	RbCl (1 M)	1 ml
	Glycerin (87 %)	17,25 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Der pH wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt und der Puffer nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.

2.17.5.3 Elektrotransformation

Zur Transformation von elektrokompenten Zellen (*E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21 (DE3) pLys) wurde der Elektroporator „MicroPulse™“ von Bio-Rad (München) verwendet. 50 μ l Zellen wurden auf Eis in einer Elektroporations-Küvette (0,2 cm) vorgelegt und 1 - 2 μ l Plasmid-DNA (ca. 70 – 100 ng/ μ l) zugegeben. Die Transformation erfolgte im Modus „EC2“ unter Abgabe eines Hochspannungspulses von 2,5 kV. Die Zellen wurden unmittelbar darauf in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Je nach Resistenz des Plasmids wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 min, 5000 g) auf LB-Agar-Platten mit 50 μ g/ml Kanamycin oder 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.17.5.4 Hitzeschocktransformation calciumkompetenter Zellen

Zur Hitzetransformation wurde zu 100 μ l calciumkompetenter Zellen 5 μ l Plasmid (ca. 70 – 100 ng/ μ l) bzw. Ligationsansatz gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation bei 42 °C für 5 min im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Die daraufhin bei 5000 g für 5 min zentrifugierten Zellen wurden in ca. 100 μ l Restüberstand resuspendiert und auf LB-Agar-Platten (je nach Resistenz mit Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.17.6 Klonierung von PCR-Fragmenten in die Vektoren pCR®2.1TOPO und pSC-A-amp/kan

Wenn eine direkte Klonierung restriktionsverdauter PCR-Produkte in den Zielvektor pET 28a erfolglos war, wurden die DNA-Fragmente in einen Zwischenvektor kloniert.

2.17.6.1 Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR®2.1TOPO

Zur Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR®2.1TOPO wurde das gleichnamige *Kit* von Invitrogen verwendet (vgl. Tabelle 2.11). Mit der dabei zum Einsatz kommenden TA-Klonierungstechnik können PCR-Produkte schnell und einfach unter Umgehung von Restriktionsenzymen in einen dafür geeigneten Vektor kloniert werden. Die von *Taq*-Polymerasen synthetisierten DNA-Fragmente weisen am 3'-Ende einen Adenin-Überhang auf und können dadurch mit einem linearisierten Vektor hybridisieren, wenn dieser dazu komplementäre 3'-Thymin-Überhänge aufweist. Die T-Überhänge des Vektors sind wiederum kovalent an eine Topoisomerase I von *Vaccinia* Virus gebunden, die unter Freisetzung des Enzyms zu einer Ligation und damit zu einer kovalenten Bindung zwischen dem DNA-Fragment und Vektor führt (Shuman, 1991). Für die Klonierung wurde folgender Ansatz verwendet.

Komponenten	Volumen (µl)
Vektor (pCR®2.1TOPO)	1
PCR-Produkt (70 – 100 ng/µl)	4
Salz-Lösung* (1/4)	1

* 1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. 2 µl davon wurden in je 100 µl elektrokompente Zellen (*E. coli* DH5α) transformiert und anschließend in 1 ml SOC-Medium für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 5000 g) wurde der größte Teil des Überstandes verworfen und die Zellen in einem kleinen Rest (ca. 50 µl) resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten (mit 50 µl X-Gal und 50 µg/ml Kanamycin beschichtet) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Klone erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin. Zur gezielten Identifizierung von korrekt ligierten Klonen wurde die Blau-Weiß-Selektion

angewendet (Koenen *et al.*, 1982). Das Prinzip dieser Technik besteht darin, dass es bei Insertion eines DNA-Fragmentes in den Vektor zu einer Inaktivierung des *lacZ*-Gens kommt, das für die β -Galactosidase kodiert. Dadurch kann das auf den Agar-Platten vorhandene X-Gal nicht mehr in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galactose gespalten werden. Diese Kolonien erscheinen somit weiß. Kommt es zu einer Religierung des Vektors ohne Insertion des PCR-Produktes, bleibt das Gen intakt und führt durch die oben beschriebene Bildung des Farbstoffes zu einer Blaufärbung der Kolonien. Jeweils mehrere weiße Kolonien wurden in einem *Colony-Screening*-PCR-Ansatz auf das Vorhandensein des entsprechenden DNA-Fragmentes getestet (vgl. Tabelle 2.18).

X-Gal	IPTG (0,1 M)	2 ml
	X-Gal (20 mg/ml)	2 ml

2.17.6.2 Klonieren von PCR-Fragmenten in den Vektor pSC-A-amp/kan

Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pSC-A-amp/kan beruht auf der selben Technik, wie sie auch für den Vektor pCR®2.1TOPO beschrieben wurde. pSC-A-amp/kan weist im Unterschied zu diesem an den 3'-Enden modifizierte Uridine auf, die mit den 3'-A-Überhängen der von *Taq*-Polymerasen-amplifizierten PCR-Fragmente hybridisieren können. Für die Klonierung wurde folgender Ansatz verwendet.

Komponenten	Volumen (μ l)
Vektor* (pSC-A-amp/kan)	1
PCR-Produkt (70 – 100 ng/ μ l)	2
Puffer**	3

* *StrataClone Vector Mix amp/kan: Catalog #: 240205-51*

** *StrataClone Cloning Buffer: Catalog #: 240205-54*

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. 1 μ l des Ansatzes wurde zu chemisch-kompetenten Zellen (im *Kit* enthalten) pipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 45 sec bei 42 °C transformiert und die Zellen nach einer zwei-minütigen Phase auf Eis in 260 μ l SOC-Medium aufgenommen. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 650 rpm für 1 h. Jeweils 5 bzw. 150 μ l wurden auf LB-

Agar-Platten (mit 50 µg/ml Kanamycin und 50 µl X-Gal beschichtet) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.17.7 Plasmidpräparation

Für die Präparation von Plasmiden wurde das *Kit* „NucleoSpin® Plasmid“ von Machery-Nagel (vgl. Tabelle 2.11) verwendet. 5 bis 10 ml einer LB-Übernachtskultur wurden bei 11000 g für 30 sec abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde unter „Vortexen“ in 500 µl Resuspensions-Puffer („Puffer A1“) aufgenommen. Die anschließende Zugabe von 500 µl Lyse-Puffer („Puffer A2“) führt unter vorsichtigem 6 – 8-maligen Wenden des Gefäßes und einer 5-minütigen Inkubation bei RT zu einem Aufschluss der Zellen durch SDS unter alkalischen Bedingungen. Nach der Zelllyse wurde der Ansatz unter Zugabe von 600 µl „Puffer A3“ neutralisiert, um optimale Bedingungen für die folgende Bindung der Plasmide an die Silica-Membran der Aufreinigungs-Säulen zu schaffen. Das Lysat wurde für 10 min bei 11000 g zentrifugiert, um genomische DNA, präzipitierte Proteine und andere Zellbestandteile abzutrennen. 750 µl des Überstandes wurden anschließend in eine Aufreinigungs-Säule pipettiert, die wiederum in einem dafür vorgesehen Sammelgefäß platziert wurde. Die Zentrifugation (1 min bei 11000 g) über die in der Säule vorhandene Silica-Membran führt zu einer Bindung der Plasmid-DNA. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran nacheinander mit jeweils 500 µl „Puffer AW“ und 600 µl „Puffer 4“ durch Zentrifugation (1 min, 11000 g) gewaschen. Nach einer Trocknung der Membran bei 2 min und 11000 g wurden die an die Membran gebundenen Plasmide mit 50 µl „Puffer AE“ für 2 min bei 70 °C inkubiert und in einem abschließenden Zentrifugationsschritt (1 min, 11000 g) eluiert.

2.17.8 Restriktionsverdau von Vektoren und PCR-Produkten

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an für sie jeweils spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen und schaffen dadurch überhängende, „klebrige“ Enden (Roberts *et al.*, 2003). Werden Vektor und Passagier-DNA mit den selben Enzymen verdaut, können sich die entsprechenden Enden durch Hybridisierung aneinanderlagern. Dies ist eine Voraussetzung für die darauf folgende Ligation, d. h. der enzymatisch vermittelten Reaktion, die zu einer kovalenten Bindung zwischen Vektor und Passagier-DNA führt. Die Verwendung von zwei verschiedenen

Restriktionsendonukleasen stellt sicher, dass die Passagier-DNA nur in der korrekten Orientierung in den Vektor ligiert werden kann.

2.17.8.1 Restriktionsverdau der Vektoren

Der Vektor pET-28a und die Zwischenvektoren „pSC-A-amp/kan“ und „pCR®2.1TOPO“ mit den darin enthaltenen PCR-Fragmenten wurden nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI (vgl. Tabelle 2.7) entsprechend den Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. Für den ersten Verdau mit BamHI wurden folgende Ansätze für 2 h bei 37 °C inkubiert.

pET-28a (BamHI-Verdau)

Komponenten	Volumen (µl)
Plasmid (70 – 100 ng/µl)	26
BamHI (10 U/µl)	2
Puffer BamHI* (10 x)	2,8

Zwischenvektoren (BamHI-Verdau)

Komponenten	Volumen (µl)
Plasmid (70 – 100 ng/µl)	30
BamHI (10 U/µl)	2
Puffer BamHI* (10 x)	3,2

*1 x Puffer BamHI: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,02 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA

Die Ansätze wurden nach Inkubation mit dem *Kit* „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (vgl. Tabelle 2.11) aufgereinigt und in je 35 µl eluiert. Der zweite Verdau mit SalI erfolgte in gleicher Weise für 2 h bei 37 °C.

pET-28a (SalI-Verdau)

Komponenten	Volumen (µl)
Plasmid (70 – 100 ng/µl)	32
SalI (10 U/µl)	2
Puffer 0* (10 x)	3,4

Zwischenvektoren (SalI-Verdau)

Komponenten	Volumen (µl)
Plasmid (70 – 100 ng/µl)	32
SalI (10 U/µl)	2
Puffer 0* (10 x)	3,4

*1 x Puffer 0: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

Nach dem Verdau mit SalI wurden die Ansätze in 1 % Agarose-Gelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die entsprechenden Banden (pET-28a, Coa, vWbp, Emp,

Efb) unter UV-Licht im Transilluminator ausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte nach dem Protokoll des *Kits* „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“.

2.17.8.2 Restriktionsverdau von PCR-Produkten

Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll des *Kits* „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (vgl. Tabelle 2.11) aufgereinigt und in 40 µl eluiert. Die Proben wurden mit 1 µl BamHI (10 U/µl) + 2 µl SalI (10 U/µl) + 5 µl BamHI-Puffer für 2 h bei 37 °C verdaut. Nach erneuter Aufreinigung wurden die verdauten PCR-Produkte für die Ligationsansätze verwendet (vgl. 2.17.9).

2.17.9 Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pET-28a

Die DNA-Ligase verbindet DNA-Stränge enzymatisch über eine Veresterung der 5'-Phosphat- mit der 3'-OH-Gruppe des DNA-Rückgrats (Lehman, 1974). Ein Ligationsansatz enthält neben der entsprechend verdauten Passagier-DNA (PCR-Produkte oder aus Zwischenvektoren durch Verdau gewonnene DNA-Fragmente) den entsprechend verdauten/linearisierten Zielvektor (pET-28a). Die Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert (16 h)

10 µl-Ansatz

Komponenten	Volumen (µl)
Vektor (70 - 100 ng/µl)	3
Passagier-DNA (70 - 100 ng/µl)	3
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	0,5
Ligase-Puffer* (10 x)	1
ATP (10 mM)	-
H ₂ O _{dest.}	2,5

20 µl-Ansatz

Komponenten	Volumen (µl)
Vektor (70 - 100 ng/µl)	7,8
Passagier-DNA (70 - 100 ng/µl)	9
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	1
Ligase-Puffer* (10 x)	2
ATP (10 mM)	0,2
H ₂ O _{dest.}	-

*10 x Ligase-Puffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 bei 25 °C)

Die Ligationsansätze wurden nach der Inkubation für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und anschließend in elektrokompente oder calciumkompetente Zellen transformiert (vgl. 2.17.5.3 und 2.17.5.4).

2.17.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration nach Plasmid-Präparationen und PCRs wurde das Spektralphotometer „NanoDrop ND-1000“ (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Bestimmung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.17.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der pET-28a-Plasmide wurde von der Firma GATC biotech (Konstanz) durchgeführt. Dazu wurden je 5 – 10 µl des Plasmids (Konzentration: 70 – 100 ng/µl) und 10 µl *Primer* „pET-UP“ (10 pmol/µl, vgl. Tabelle 2.8) in 1,5 ml Eppendorfgefäßen verschickt. Der *Primer* „pET-RP“ (vgl. Tabelle 2.8) war bei der Firma vorrätig. Die Sequenzierung wurde nach der Dideoxy-Methode nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die Ergebnisse wurden mit der Software „CLC main workbench“ (CLC bio, Aarhus) ausgewertet.

2.17.12 MALDI-TOF

Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden mittels MALDI-TOF (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight*) analysiert und identifiziert. Dazu wurden die Coomassie-gefärbten Proteinbanden akkurat mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die anschließende Analyse wurde vom Zentrallabor für Proteinanalytik (LMU München) durchgeführt. Nach einem Trypsin-Verdau wird das in eine Matrix eingebettete Analysat mit einem Laser ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Durch die nachfolgende massenspektrometrische Analyse (Molekulargewicht der Oligopeptid-Ionen) kann nach Abgleich mit einer entsprechenden Datenbank zur Proteinanalyse (Mascot) das ursprüngliche Protein identifiziert werden.

2.18 Zellbiologische Methoden

2.18.1 Kultivierung von Hybridomazellen

Zur Kultivierung von Hybridomazellen wurde das in Abschnitt 2.4.1 aufgeführte Zellkulturmedium verwendet. Die Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, im CO₂-Brutschrank (Heraeus Typ BBD 6220) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Die Umsetzung der Zellen erfolgte, sobald das Medium einen Farbumschlag von rosa nach gelblich zeigte.

2.18.2 Einfrieren von Hybridomazellklonen

Zur Kryokonservierung von Hybridomazellen wurden 10 ml einer Zellkultur in der log-Phase abzentrifugiert (2000 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellsediment schonend in 1 ml Einfriermedium (vgl. 2.4.1) resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 500 µl auf zwei Einfrierröhrchen (CryoPure, 2,0 ml, Sarstedt) aufgeteilt und in einer Einfrier-Box (CoolCell® LX) bei – 80 °C gelagert. Dieses Einfriersystem gewährleistet durch einen konstanten und langsamen Temperaturabfall von – 1 °C/min ein schonendes Einfrieren der Zellen. Am folgenden Tag wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt und bei – 176 °C kryokonserviert.

2.18.3 Auftauen von Hybridomazellen

Eingefrorene Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium (37 °C) schonend resuspendiert und im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Falls die Zellen nach dem Auftauen nicht erfolgreich kultivierbar waren, wurden die Zellen beim erneuten Auftauprozess in 5 ml Zellkulturmedium (37 °C) resuspendiert und anschließend für 5 min bei 1200 g zentrifugiert, um das im Einfrier-Medium vorhandene zytotoxische DMSO zu entfernen. Das Zellsediment wurde dann in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf 6-Well-Zellkulturtestplatten im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.19 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Ein potentes System zur Expression größerer Mengen rekombinanter Proteine stellt das 1986 von Studier und Moffatt entwickelte T7-Expressionssystem dar (Studier und Moffatt, 1986). Dabei steht das Gen des zu exprimierenden Proteins im Zielvektor (pET-28a) unter Kontrolle eines T7-Promotors. Zur Transkription und Expression des Zielproteins kommt es nach Transformation des Plasmids in einen Expressionsstamm (*E. coli* BL21 (DE3) pLys), der die für den T7-Promotor hochspezifische RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen DE3 chromosomal kodiert. Diese Polymerase wird erst nach Induktion des Promotors *lacUV5* durch IPTG exprimiert. Dem Zielprotein wird ein im Vektor kodierter N-terminaler Hexahistidyl-Rest vorgeschaltet. Dieser (His)₆-Tag ermöglicht später eine affinitätschromatographische Aufreinigung der exprimierten Proteine. Dabei kommt die Ni-NTA-Technologie zum Einsatz (Janknecht *et al.*, 1991). Die an Sepharose immobilisierte Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert dabei ein Ni²⁺-Ion und besetzt damit 4 der 6 bipyramidalen Bindungsstellen des Ions. An die zwei freien

Stellen können nun noch zwei Imidazol-Reste des (His)₆-Tags binden. Die Bindung des (His)₆-Tags kann kompetitiv durch ausreichend hohe Konzentrationen Imidazol im Puffer wieder gelöst werden. Der Zusatz niedrigkonzentrierten Imidazols (bis 20 mM) führt zu keiner Verdrängung des gebundenen (His)₆-Tags, jedoch werden dadurch unspezifisch gebundene Proteine aus ihrer Bindung gelöst, sodass bei der anschließenden Elution das Zielprotein nur noch eine geringfügige Verunreinigung aufweist. Bei der Elution kommt es durch Zusatz sehr hoher Konzentrationen an Imidazol (250 mM) im entsprechenden Puffer zu einer Verdrängung des (His)₆-Tags aus seiner Bindung. Die Protokolle und vorangehenden Darstellungen zur Expression und Aufreinigung sind mit Modifikationen dem „Handbook for high-level expression and purification of 6 x His-tagged proteins“, 5. Auflage, Juni 2013 von Qiagen entnommen.

2.19.1 Produktionsanalyse

Vor der Induktion und Produktion größerer Mengen der rekombinanten Proteine wurde eine Produktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden je 5 ml LB-Medium im Verhältnis 1:40 (125 µl) mit einer LB-Übernachtskultur der mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Expressionsstämme angeimpft. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 180 rpm wurde folgendermaßen weiterverfahren: Eine Kultur (5 ml) wurde mit 5 µl IPTG (1 M) induziert, eine Kultur mit 2 % Glucose inhibiert und eine Kultur wurde ohne weitere Zusätze belassen. Die Kulturen wurden für weitere 2 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Je 1 ml dieser Kulturen wurde abzentrifugiert und das Zellsediment in je 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Zur Analyse wurden je 10 µl in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt.

2.19.2 Löslichkeitstest

Das Protokoll der Aufreinigung der rekombinanten Proteine hängt von deren Löslichkeit ab. Um zu testen, in welcher Fraktion (löslich oder unlöslich) sich das exprimierte Protein befand, wurden 5 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) 1:40 mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 125 µl IPTG (1 M). Die Expression erfolgte unter den gleichen Inkubationsbedingungen. Nach dieser Phase wurde 1 ml der Kultur abzentrifugiert und das Zellsediment in 150 µl „BugBuster“ (Merck Millipore, Darmstadt) resuspendiert und für 30 min bei RT geschwenkt. Für die anschließende Analyse in einer SDS-PAGE wurden daraus folgende Fraktionen gewonnen:

MATERIAL UND METHODEN

- **Gesamtzelllysat** 20 µl + 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer
- **Unlösliche Fraktion** Zentrifugation von 20 µl bei 4 °C und 14500 rpm für 30 min, Resuspension des Sediments in 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer
- **Lösliche Fraktion** Zentrifugation von 80 µl bei 4 °C und 14500 rpm für 30 min, 20 µl des Überstandes wurden mit 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer gemischt.

Nach Aufkochen der Proben bei 100 °C für 5 min wurden je 10 µl in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt.

2.19.3 Induktion

Zur Herstellung und Aufreinigung größerer Mengen rekombinanter Proteine wurden je 200 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) mit 5 ml LB-Übernachtskultur (50 µg/ml Kanamycin) der entsprechenden Expressionsstämme angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Kulturen mit 0,1 mM IPTG (20 µl IPTG, 1 M) induziert und für weitere 2 h wie zuvor inkubiert. Die Kulturen wurden dann für 20 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Sofern nicht unmittelbar mit der Aufreinigung fortgefahren wurde, wurden die Zellsedimente bei -20 °C konserviert.

2.19.4 Aufschluss der Zellen und Aufreinigung der produzierten Proteine

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die Sedimente aus induzierten Kulturen in Lyse-Puffer (7 ml/g Zellsediment) resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Applikation von 300 W-Ultraschall-Pulsen (20 x für je 10 sec und jeweils 10 sec Pause dazwischen) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 10 µg/ml RNase A wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 10000 g und 4 °C. 5 µl des Überstandes wurden vor weiterer Verarbeitung für spätere Analysen aufgehoben. Zu 5 ml des restlichen Überstandes wurden 500 µl Ni-NTA-Agarose gegeben und für 60 min bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Lysat-Ni-NTA-Mischung wurde anschließend in eine Chromatographie-Säule (Bio-Rad) gegeben. Der 1. Durchfluss wurde verworfen und die Säule 2 x mit 4 ml und 1 x mit 2 ml Waschpuffer gewaschen.

Anschließend wurden die gebundenen Proteine 4 x mit je 200 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst.

Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6,90 g
	NaCl	17,54 g
	Imidazol	0,68 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH	8,0 (mit NaOH eingestellt)
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6,90 g
	NaCl	17,54 g
	Imidazol	1,36 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH	8,0 (mit NaOH eingestellt)
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6,90 g
	NaCl	17,54 g
	Imidazol	17,00 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH	8,0 (mit NaOH eingestellt)

2.19.5 Dialyse der aufgereinigten Proteine

Um das im Elutionspuffer hochkonzentrierte Imidazol zu entfernen und die Proben auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 einzustellen, wurden die aufgereinigten Proteine dialysiert. Dazu wurden das System „D-Tube™ Dialyzer, Midi“ (Merck Millipore) verwendet. Nach einer fünf-minütigen Hydratisierung der Dialysemembran mit H₂O_{dest.} wurden 600 µl Probe in das Dialysegefäß gegeben und mit einem Schwimmer in 500 ml Dialyse-Puffer (50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, pH 7,4) für 5 h bei 4 °C auf einem Magnetrührer dialysiert.

2.20 Herstellung monoklonaler Antikörper

Seit der Erstpublikation einer Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) haben sich diese heute nach einer rasant verlaufenden Entwicklung in weiten Bereichen von Diagnostik, Therapie und Forschung etabliert und dadurch eine enorme Bedeutung erlangt. Monoklonale

Antikörper werden von Hybridomazellklonen produziert, die ursprünglich aus einer Fusionszelle (Myelomzelle + Plasmazelle) hervorgegangen sind. Dies bedingt ihre hohe, gegen ein einzelnes Epitop gerichtete Spezifität. Gleichzeitig besteht damit die Möglichkeit ihrer unbegrenzten Produktion. Grundlage der Herstellung monoklonaler Antikörper ist die von Köhler und Milstein 1975 publizierte Hybridom-Technik. In dieser Arbeit wurden die Antikörper nach folgendem modifizierten Protokoll hergestellt (Heesemann *et al.*, 1986, Niebuhr und Ebel, 2003).

2.20.1 Immunisierung der BALB/c-Mäuse

Während der Immunisierungsphase kommt es durch Applikation des Zielantigens zu einer Bildung spezifischer gegen dieses Protein gerichteter antikörperproduzierender Plasmazellen/ β -Lymphoblasten. Als Antigene wurden die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine (vgl. 3.2.1), sowie die TCA-gefällten Kulturüberstandsproteine (vgl. 2.16.4) von *S. aureus* Newman verwendet. Nach entsprechender Vorbereitung der Proben wurden sie jeweils drei BALB/c-Mäusen nach folgendem Schema intraperitoneal injiziert.

Tag 1	250 μ l Antigen-Lösung + 250 μ l Freud'sches Adjuvans (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Tag 14	250 μ l Antigen-Lösung + 250 μ l Freud'sches Adjuvans (Sigma-Aldrich, Hamburg)
Tag 28	Injektion von 250 μ l Antigen-Lösung
Tag 32	Entnahme der Milz und Anreicherung der Lymphozyten

2.20.2 Fusion

Im Rahmen der Fusion kommt es unter begünstigenden Faktoren zu einem Verschmelzen der aus der Maus-Milz isolierten Lymphozyten mit den zuvor expandierten murinen Myelomzellen (P3-X63-Ag8.653). Die dabei entstehenden Hybridomazellen können unter geeigneten Bedingungen gezielt selektioniert werden. Die Expansion der Myelomzellen erfolgte 10 – 12 Tage vor der Fusion in entsprechendem Zellkulturmedium (s. u.). Zum Zeitpunkt der Milzentnahme lagen somit ca. 4×10^8 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase auf 10 – 12 Zellkulturschalen verteilt vor. Die Myelomzellen wurden am Tag der Fusion resuspendiert. Um auch adhärenzte Zellen zu lösen, erfolgte dies unter mehrfachem, vorsichtigen Auf- und

MATERIAL UND METHODEN

Abpipettieren. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml-Reaktionsgefäße verteilt und anschließend bei 950 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden nach einem Waschschrift in HEPES-Medium ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension der Zellen in HEPES-Medium wurden diese mit dem gleichzeitig hergestellten Lymphozyten-Sediment zusammengeführt und vorsichtig durchmischt. Die nun gemischte Zellsuspension wurde bei 950 rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellsediment nach vollständiger Abnahme des Überstandes durch vorsichtiges Schütteln im 37 °C-Wasserbad aufgelockert. Die Folgenden Schritte wurden ebenfalls im Wasserbad bei konstant 37 °C unter vorsichtigem Schwenken durchgeführt:

Zugabe von...	Volumen (ml)	Zeit der Zugabe (sec)
PEG-4000-Lösung	1	30
HEPES-Medium	1	30
HEPES-Medium	3	30
HEPES-Medium	16	60

Polyethylenglykol begünstigt dabei ein dichtes Aneinanderlagern von Zellen, sodass es zu spontanen Zellfusionen kommen kann. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min zentrifugiert und in 200 ml HA-Selektionsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zuvor vorbereitete 24-Well-Zellkulturtestplatten (TPP) zu je 1 ml verteilt und für 10 bis 14 Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Während dieses Zeitraumes kommt es zu einer gezielten Selektion von Hybridomazellen. Nicht fusionierte Maus-Lymphozyten können sich in Zellkultur nicht unbegrenzt teilen und gehen deshalb in absehbarer Zeit zugrunde. Unfusionierte Myelom-Zellen können aufgrund eines Defektes im Purinsynthese-Weg das im Medium vorhandene Hypoxanthin nicht weiter verwerten. Da durch das im Medium vorhandene Azaserin auch die *de novo*-Purinsynthese blockiert ist, sind diese Zellen auf längere Sicht nicht überlebensfähig. Kommt es jedoch zu einer Fusion der Myelomzelle mit einem B-Lymphoblasten wird der Defekt durch das intakte Genom des Lymphozyten komplementiert. Die zur DNA-Synthese essentiellen Purine können nun selektiv von Hybridomazellen aus dem im Medium vorhandenen Hypoxanthin

MATERIAL UND METHODEN

synthetisiert werden, sodass nur dieser Zelltyp überleben und proliferieren kann (Peters und Gieseler, 1990).

HEPES-Medium	DMEM	
	25 mM HEPES-Puffer	
	pH 7,0	
Zellkulturmedium	RPMI 1640-Medium	500 ml
	FCS	50 ml
	Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
PEG 4000-Lösung	PEG 4000	5 g
	HEPES-Medium	5 ml (60 °C)
	pH	7,4
	Sterilfiltration	
HA-Selektionsmedium	Opti-MEM® Medium	500 ml
	FCS	25 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Hypoxanthin	20 mg/l
	Azaserin	1,5 mg/l

2.20.3 Testen der Hybridomazell-Überstände auf spezifische Antikörper

Da nicht jede fusionierte Zelle zu einem Hybridoma-Klon mit spezifischer Antikörper-Produktion führt, müssen diese mit einem entsprechenden Verfahren überprüft werden. Nach der 10 – 14-tägigen Selektionsphase können größere klonale Hybridomazellaggregate in der Regel mit bloßem Auge erkannt werden und kleinere zusätzlich mit dem Mikroskop detektiert werden. Auf diese Weise wurden Überstände für das folgende *Screening* ausgewählt. Als Testverfahren wurde der *Immunoblot* verwendet. Hierzu wurde das auch für die Immunisierung der BALB/c-Mäuse verwendete Antigen nach dem in Abschnitt 2.16.3 beschriebenen Protokoll auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Um das Antigen (rekombinantes Protein oder TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine) kontinuierlich der gesamten Breite der PAGE-Platte

folgend zu verteilen, wurde ein Spezialkamm mit zwei Zähnen verwendet. Der erste kleinere Zahn schaffte dabei eine Tasche zur Aufnahme des Protein-Größenmarkers, während der zweite eine kontinuierliche, über die restliche Breite des SDS-Polyacrylamid-Gels sich erstreckende Tasche zur Aufnahme des Antigens schaffte. Zum Testen vieler Überstände bei gleichzeitig kleinen Volumina eignet sich das „Miniblotter-System von Biometra“. Die zuvor hergestellten *Testblots* werden darin eingespannt. Durch Aussparungen in der Deckplatte entstehen über der Membran 16 voneinander getrennte Hohlräume, die jeweils 150 µl Probe (z. B. Zellkulturüberstand) aufnehmen können. Je nach Größe des entsprechenden Gels konnten so pro *Blot* 14 bis 15 Überstände getestet werden. Nach Auftragen der Proben wurden die *Blots* für 1 h bei RT inkubiert. Vor dem Öffnen des Systems wurden die Überstände entfernt und die Membranen anschließend möglichst schnell in Waschpuffer überführt. Die weiteren Schritte der Färbung und Entwicklung der *Immunoblots* sind in Abschnitt 2.16.3 beschrieben. Als sekundärer Antikörper wurde α -Maus IgG/IgM AP (vgl. Tabelle 2.10) verwendet. Positive Klone wurden schrittweise von den 24-Well-Zellkulturtestplatten über 6-Well-Platten bis 10 ml Volumen in einer Petrischale expandiert und anschließend eingefroren (vgl. 2.18.2) und kloniert (vereinzelt) (vgl. 2.20.4).

2.20.4 Klonierung positiver Hybridoma-Klone

In den nach der Selektionsphase positiv getesteten Überständen finden sich neben dem antikörperproduzierenden Klon in der Regel weitere Hybridomaklone. Bei der nachfolgenden Expansion kann es dazu kommen, dass der für die Antikörperproduktion verantwortliche Klon von anderen, schneller wachsenden Zellen verdrängt wird und damit unentdeckt bleibt. Um dies zu verhindern, und um sicherzustellen zu können, dass die Antikörper aus einem einzelnen Klon hervorgingen und so als monoklonal bezeichnet werden konnten, wurden die Zellen in mehreren Verdünnungsstufen so vereinzelt, dass die daraus gewonnenen Klone mit großer Sicherheit auf eine einzelne Ursprungszelle zurückzuführen waren. Dazu wurden 10 ml einer entsprechenden Zellsuspension nach einem erneuten positiven Test (im *Immunoblot*) für 5 min bei 1200 g abzentrifugiert und in 3 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und ausgehend von diesem Wert auf 50×10^4 Zellen/ml durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Medium eingestellt. Davon ausgehend wurde $3 \times 1:10$ mit einem Endvolumen von jeweils 10 ml Zellkulturmedium verdünnt. Ausgehend von der letzten Verdünnungsstufe (50×10^1 Zellen/ml) wurde

erneut 3 x 1:10 verdünnt. Da die letzten drei Verdünnungsstufen für die Verteilung auf 96-Well-Zellkulturtestplatten bestimmt waren, wurde für diese ein Endvolumen von jeweils 25 µl gewählt. Pro Verdünnungsstufe wurde eine 96-Well-Zellkulturtestplatte mit 200 µl/Well beladen und anschließend für 8 bis 10 Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Für die drei Testplatten ergaben sich somit rechnerisch folgende Zellzahlen:

- 10 Zellen/Well (200 µl)
- 1 Zelle/Well (200 µl)
- 0,1 Zellen/Well (200 µl)

Die Platten wurden nach der Inkubationszeit makro- und mikroskopisch auf Vorhandensein von Zellklonen geprüft. Für den anschließenden Test auf Antikörperproduktion wurden soweit möglich Klone aus der Testplatte der niedrigsten Verdünnungsstufe (0,1 Zellen/Well) bevorzugt, da bei diesen die Wahrscheinlichkeit einer monoklonalen Linie am höchsten war. Die Tests auf positive Klone wurden wie in Abschnitt 2.20.3 beschrieben durchgeführt.

2.20.5 Isotypisierung der Antikörper

Antikörper unterscheiden sich neben ihrer Antigen-erkennenden, spezifischen Region in einem weiteren Strukturelement: dem Fc-Teil. Danach können Antikörper in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Paul, 2003). Zur Isotypisierung, d. h. der Zuordnung der in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper zu einer bestimmten Immunglobulin-Klasse wurde das „Rapid Antibody Isotyping Kit – Mouse“ von Pierce™ verwendet. Damit konnte eine Zuordnung zu den Ig-Klassen IgA, IgM, IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{2b} erfolgen. Unverdünnter Zellkulturüberstand wurde dazu 1:10 mit der im Kit vorhandenen Lösung gemischt. Davon wurden 150 µl in die zur Probenaufnahme vorgesehene Vertiefung pipettiert. Das Ergebnis konnte nach 10 – 15 min Inkubation bei RT abgelesen werden.

2.21 Analyse und Färbung von Staphylokokken im 3D-Kollagengel (3D-CoG)

Das 3D-Kollagengel (3D-CoG) stellt eine gewebeähnliche Matrix zur *in vitro*-Untersuchung des Wachstums und Verhaltens verschiedenster Mikroorganismen sowie der Leukozytenmigration dar (Friedl und Brouck, 2000, Behnsen *et al.*, 2007, Freund *et*

al., 2008, Lammermann *et al.*, 2008). Guggenberger *et al.* entwickelten 2012 ein darauf basierendes Modell zur Analyse des Wachstumsverhaltens von Staphylokokken (Guggenberger *et al.*, 2012). Dabei wurde das 3D-CoG optional mit Fibrinogen (3D-CoG/F) oder mit Fibrinogen und Prothrombin (3D-CoG/FP) supplementiert. Die Herstellung und weitere Verarbeitung, sowie Immunfärbungen der 3D-Kollagengele wurden mit einigen Modifikationen wie bei Guggenberger *et al.*, 2012 beschrieben durchgeführt. In dieser Arbeit wurde statt Ziegen Serum Kaninchenserum in der Blockierlösung verwendet. Außerdem wurde das Überschichtungsmedium neben Fibrinogen standardmäßig mit Prothrombin in einer Endkonzentration von 4 µg/ml supplementiert.

2.21.1 Herstellung der 3D-Kollagengele (3D-CoG/FP)

Die Herstellung der 3D-Kollagengele und die Kultivierung von Staphylokokken darin wurden wie bei Guggenberger *et al.*, 2012 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden zunächst die beiden Grundkomponenten des 3D-Kollagengels hergestellt.

Kollagen-Stocklösung		+	S. aureus-Suspension	
Komponenten	Volumen (µl)		Komponenten	Volumen (µl)
Natriumbicarbonat (Lösung 7,5 %)	5		TSB-Übernachtskultur von <i>S. aureus</i> (OD ₆₀₀ : 3,0, 2x 1:250 in PBS verdünnt)	250
MEM (10x)	10			
Bovines Typ I-Kollagen (3 mg/ml)	75			

Die beiden Komponenten wurden im Verhältnis 2:1 ($\frac{2}{3}$ Kollagen-Stocklösung, $\frac{1}{3}$ Bakteriensuspension, ca. 2×10^4 cfu/ml) gemischt. Pro Gel wurden 10 µl dieser Mischung in einen Napf eines „µ-Slide 8 Well“ von Ibidi (München) pipettiert und für 45 min bis 1 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C auspolymerisiert. Eine erfolgreiche Gelierung war an einer milchigen Trübung des Gels nach dieser Zeit erkennbar. Erst wenn dies der Fall war konnte mit der Überschichtung des Kollagengels fortgefahren werden. Falls nicht anders angegeben, wurden dazu 150 µl RPMI 1640 (*no phenol red*) auf 37 °C erwärmt und mit 3 mg/ml Fibrinogen und 4 µg/ml Prothrombin versetzt. Nach vorsichtiger Überschichtung wurden die 3D-Kollagengele für 16 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert.

2.21.2 Färbung der 3D-Kollagengele (3D-CoG/FP)

Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von sezernierten Proteinen wurden die 3D-CoG/FP mit den in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörpern (unverdünnter Zellkulturüberstand) inkubiert. Davor wurden die Gele für 20 min bei RT mit je 150 µl 4 % PFA überschichtet. Dies führt zu einer Fixierung. Nach drei fünf-minütigen Waschschritten mit je 150 µl 1 x PBS wurden die 3D-CoG/FP für 1 h bei RT blockiert.

Blockierlösung 3 % BSA (w/v)
 5 % Kaninchenserum (v/v)
 in PBS

Darauf folgte eine 1,5-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper (unverdünnter Zellkulturüberstand der Hybridomazellklone). Nach Abnahme der Überstände und 3 x 5 min Waschen mit je 150 µl PBS wurden die Gele für 1 h im Dunkeln mit 150 µl Sekundärantikörper-Lösung inkubiert (Ziege- α -Maus IgG Cy3, vgl. Tabelle 2.10). Dieser wurde zuvor 1:100 in Blockierlösung (s. o.) verdünnt. Nach drei weiteren Waschschritten mit je 150 µl PBS wurden die Gele mit PBS überschichtet und bis zu mikroskopischen Analyse im konfokalen Lasermikroskop bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Optional wurden die Gele nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper mit DAPI (1 µg/ml) zur spezifischen Darstellung der bakteriellen DNA und FITC-Lektin (5 µg/ml) zur Visualisierung von bakteriellen Zellwandbestandteilen (FITC-Lektin bindet N-Acetyl- β -D-glucosamin-Reste und N-Acetyl- β -D-glucosamin-Oligomere) gefärbt und danach 3 x mit je 150 µl PBS gewaschen.

2.21.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der 3D-Kollagengele erfolgte mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Dazu wurde das Mikroskop Leica SP5 (Leica, Wetzlar) mit 40 x und 63 x Ölimmersions-Objektiven (Okular: 10 x) verwendet. Die Prozessierung und anschließende Bearbeitung der Bilder erfolgte unter Verwendung der Software LAS AF (Leica, Wetzlar).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen sezernierte Kulturüberstandsproteine (SERAMs) von *Staphylococcus aureus*

Die Herstellung monoklonaler Antikörper basiert auf der in Kapitel 2.20 dargestellten Methode. Unterschiede der generierten Antikörper liegen unter anderem in der Art des für die Immunisierung verwendeten Antigens begründet. Zur Herstellung und Aufbereitung der interessierenden Zielantigene (sezernierte Proteine von *S. aureus*, (SERAMs)) wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Ansätze gewählt.

Sezernierte Proteine von *S. aureus* finden sich in größeren Mengen im Kulturüberstand einer entsprechenden bakteriellen Flüssigkultur und können daraus mittels TCA-Präzipitation aufkonzentriert werden (vgl. 2.16.4). Proben dieser Art weisen eine große Diversität bezüglich Art, Menge und Immunogenität der darin vorhandenen Antigene auf. Dabei ist vorteilhaft, dass die daraus generierten Antikörper im günstigen Fall eine entsprechend große Vielfalt bezüglich Spezifität für unterschiedliche Antigene und Epitope aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der rekombinanten Herstellung interessierender Zielantigene wie z. B. Coa, vWbp, Emp und Efb.

3.1.1 Herstellung der Antigene

Vor der Immunisierungsphase mussten die entsprechenden Antigene in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen. Dazu wurden Kulturüberstandsproteine des Stammes *S. aureus* Newman mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (vgl. 2.16.4). Um auszuschließen, dass sich der pH der Probe aufgrund von TCA-Rückständen in einem zu sauren Bereich befand, wurde dieser mit einem pH-Indikatorpapier (Merck Millipore) überprüft. Der Erfolg der Proteinfällung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. Abbildung 3.1).

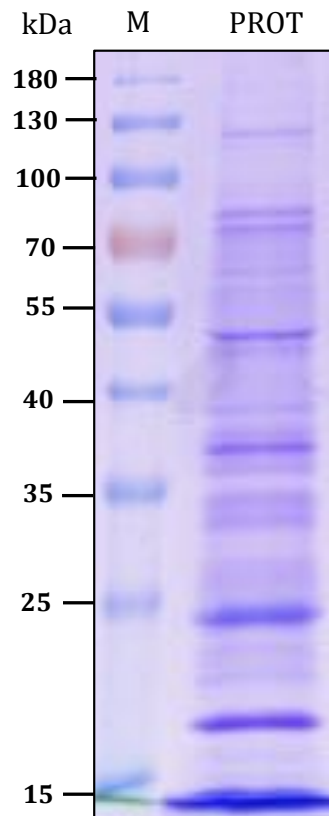


Abbildung 3.1: Spektrum sezernierter Kulturüberstandsproteine des Stammes *Staphylococcus aureus* Newman (SDS-PAGE)

In einer 12 % SDS-PAGE wurden 7 µl Probe (TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine aus ca. 4 ml Flüssigkultur) aufgetrennt. Das Probenvolumen wurde zuvor 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C solubilisiert. M: Markerproteine in kDa; PROT: TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine.

Diese Probe wurde zur Immunisierung von insgesamt 3 BALB/c-Mäusen verwendet. Dazu wurde das in Abschnitt 2.20.1 beschriebene Protokoll verwendet. Nach der Fusion (vgl. 2.20.2) und der Phase der Selektion konnten die Überstände und damit der Erfolg der Immunisierung mit den dafür hergestellten *Screeningblots* nach dem in Abschnitt 2.20.3 beschriebenen Schema auf spezifische Antikörperproduktion getestet werden.

3.1.2 Ergebnisse des Screenings

Im ersten Testlauf wurden alle Überstände von makro- oder mikroskopisch erkennbaren Klonen getestet. Davon zeigten sich zahlreiche reaktiv gegen mindestens eines der in Abbildung 3.1 dargestellten Proteine. Positive Überstände wurden auf 6-Well-Zellkulturtestplatten expandiert und anschließend erneut auf reaktive Antikörper überprüft. Wie bereits dargestellt, kann es im Rahmen der Expansion zu einem Verlust

des für die Antikörperproduktion verantwortlichen Klons kommen, sodass nur Klone, die im zweiten *Screening* erneut positiv waren, weiter expandiert wurden. Diese wurden zudem durch Kryokonservierung asserviert (vgl. 2.18.2).

3.1.3 Klonierung positiver Klone

Klone, die nach einem weiteren *Screening* positiv waren, wurden nach der in Abschnitt 2.20.4 beschriebenen Methode vereinzelt. Auf diese Weise konnten mehrere Monoklone selektiert werden, deren Antikörper spezifische Reaktivität gegen sezernierte Staphylokokken-Proteine zeigten. Dazu wurden *Testblots* (*Screeningblots*) verwendet (vgl. Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Western Blot TCA-gefällter *S. aureus*-Kulturüberstandsproteine (Ponceau S-gefärbt)

Zur Herstellung des Western Blots vgl. Abschnitt 2.20.3. In einer 12 % SDS-PAGE wurden 95,2 µl Probe (TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine aus ca. 50 ml Flüssigkultur) aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde der Blot vor dem Blockieren mit Ponceau S gefärbt. M: Markerproteine in kDa.

3.1.3.1 Monoklonaler Antikörper A214C9 (α-Emp)

Klon A214 zeigte im *Immunoblot* Reaktivität gegen eine Proteinbande von ca. 38 kDa. Die darauf folgende Klonierung (Vereinzelung, vgl. 2.20.4) war erfolgreich, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die von Subklon A214C9 produzierten Antikörper monoklonal waren. Das Epitop lag auf einem ca. 38 kDa großen, sezernierten Protein von *Staphylococcus aureus* Newman, dessen Identität noch überprüft werden musste. Die Durchsicht einschlägiger Literatur ergab, dass Emp (Extrazelluläres Matrix-

Bindeprotein) aufgrund seiner Molekülmasse von 38,5 kDa (Hussain *et al.*, 2001a) mit dem gesuchten Protein identisch sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine entsprechende Deletionsmutante herangezogen (*S. aureus* Newman *vwbp emp*, vgl. Tabelle 2.1). Der *Immunoblot* in Abbildung 3.3 zeigt, dass mAk A214C9 ein Protein in einem Molekulargewichtsbereich von 38 kDa bindet, das sich bei *Staphylococcus aureus* Newman nachweisen lässt, nicht jedoch bei einer entsprechenden Deletionsmutante (Δemp). Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich das von A214C9 erkannte Epitop auf dem Extrazellären Matrix Bindeprotein (Emp) befand. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde getestet, ob der monoklonale Antikörper auch rekombinant hergestelltes Emp (vgl. 3.2.1.3.2) bindet. In einem entsprechend durchgeführten *Immunoblot*, konnte eine Reaktion mit rekombinant hergestelltem Emp nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Um auszuschließen, dass es sich dabei um eine unspezifische Bindung handelte, wurden weitere in dieser Arbeit hergestellte rekombinante Proteine mit dem Antikörper A214C9 inkubiert. Gegen keines dieser Proteine (Coa, vWbp, Efb, vgl. Abschnitte 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.4) zeigte sich der mAk A214C9 reaktiv. Diese Ergebnisse legten nahe, dass mAk A214C9 spezifisch ein Epitop des Emp von *Staphylococcus aureus* Newman bindet. Die immunfluoreszenzmikroskopische Anwendung des mAks ist in Abschnitt 3.4.2 beschrieben.

ERGEBNISSE

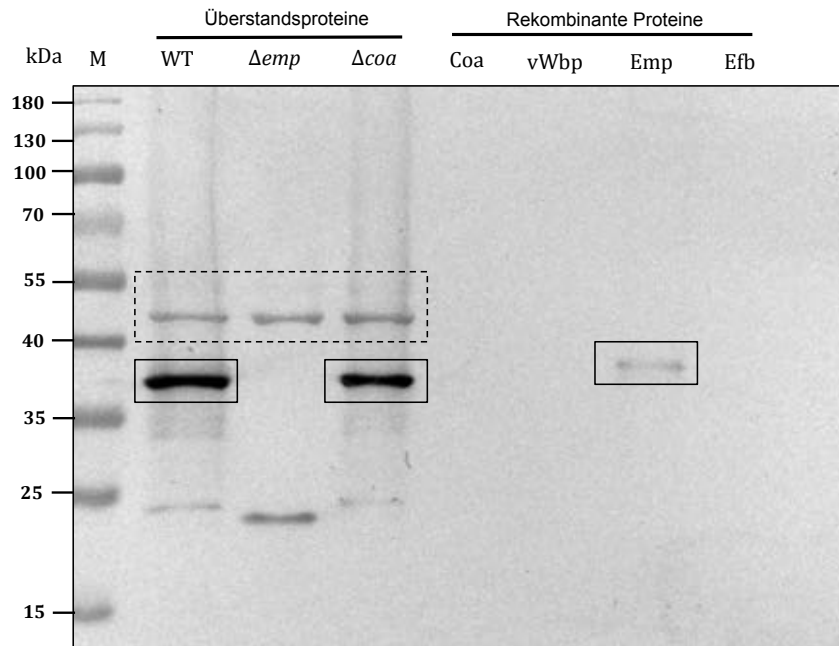


Abbildung 3.3: mAk A214C9 (α -Emp-Immunoblot)

Test von mAk A214C9 (α -Emp) im Immunoblot. Die Proben (TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur bzw. je ca. 0,5 μ g rekombinantes Protein) wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons A214C9 verwendet, als Sekundärantikörper α -Maus IgG/IgM AP. M: Markerproteine in kDa, WT: *S. aureus* Newman, Δemp : *S. aureus* Newman *vwbp emp*, Δcoa : *S. aureus* Newman *coa*, Coa: rekombinante Coa, vWbp: rekombinantes vWbp, Emp: rekombinantes Emp, Efb: rekombinantes Efb. Zur Vergleichbarkeit Mengen an gefällten Proteinen wurden die OD_{600} der entsprechenden Kulturen auf 0,8 eingestellt. Durchgehender Rahmen: Emp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

Die Detektionsgrenze von mAk A214C9 (α -Emp) wurde im Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Emp evaluiert (vgl. Abbildung 3.4).

ERGEBNISSE

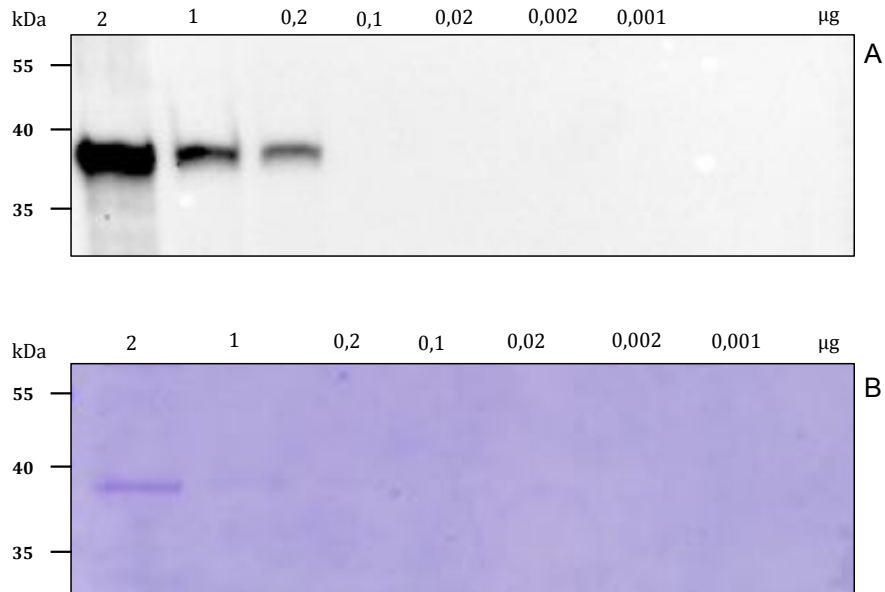


Abbildung 3.4: Detektionsgrenze von mAk A214C9 (α-Emp-Immunoblot) (A) und SDS-PAGE (B)

Zur Evaluierung der Detektionsgrenze von mAk A214C9 wurde ein Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Emp angefertigt (A). Dazu wurden die Proben in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons A214C9, als Sekundär-Ak α-Maus IgG HRP verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München), (vgl. 2.16.3.4). Die Detektionszeit betrug 165 sec. In B ist die entsprechende Coomassie-gefärbte SDS-PAGE dargestellt. Mit mAk A214C9 ließen sich noch 0,2 µg des rekombinanten Emp detektieren.

Die Isotypisierung (vgl. 2.20.5) von mAk A214C9 ergab, dass es sich um einen Antikörper der Klasse IgG₁ handelt (Abbildung 3.5).

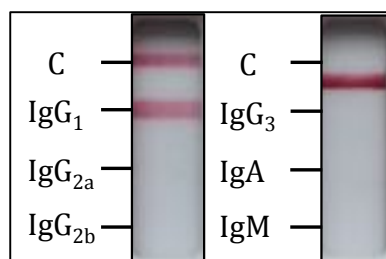


Abbildung 3.5: Isotypisierung von mAk A214C9 (α-Emp)

Zur Isotypisierung wurde das Kit „Rapid Antibody Isotyping Kit – Mouse“ von Pierce™ verwendet (vgl. 2.20.5). Ist die Kontrolle positiv (C), kann das Ergebnis direkt abgelesen werden. mAk A214C9 ist demnach der Klasse IgG₁ zuzuordnen.

3.1.4 Monoklonaler Antikörper A198F3 (α -IsaA)

Der monoklonale Antikörper A198F3 bindet in einem Test-*Immunoblot* ein Protein einem Molekulargewichtsbereich von ca. 25 kDa. Um die Identität des Antigens zu klären, wurde die entsprechende Proteinbande aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF (vgl. 2.17.12) analysiert. Danach handelt es sich bei dem von mAk 198F3 gebundenen Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um das *Immunodominant surface antigen A* (IsaA) (Abbildung 3.6).

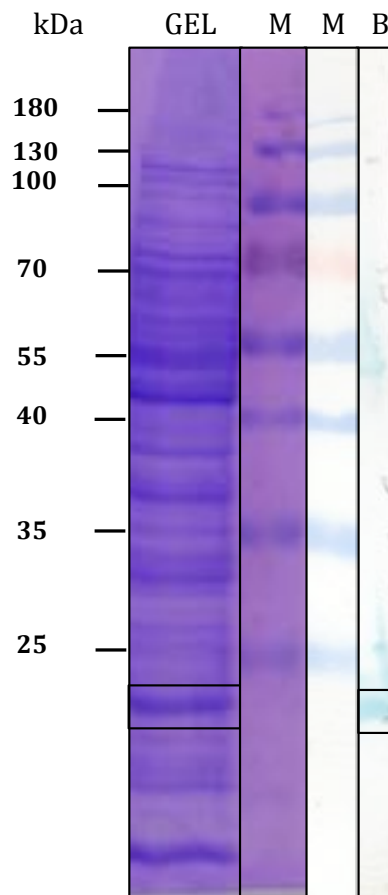


Abbildung 3.6: mAk A198F3: α -IsaA-Immunoblot und SDS-PAGE

In dieser Abbildung wurden die Markerproteine in kDa (M) der SDS-PAGE (GEL) und des α -IsaA-Immunoblots (B) von mAk A198F3 durch Bildbearbeitung nebeneinander gelegt, sodass die von mAk A198F3 gebundene Proteinbande in der entsprechenden Coomassie-gefärbten SDS-PAGE (GEL) identifiziert werden konnte. Die umrahmte Proteinbande der SDS-PAGE wurde ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert. Top-Resultat dafür war IsaA. Für die 15 % SDS-PAGE (GEL) und den Immunoblot (B) wurden TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine des Stammes *S. aureus* Newman aus je ca. 4 ml Flüssigkultur aufgetragen. Für die Färbung des Blots wurde mAk A198F3 (Zellkulturüberstand) 1:100 in TBS-T verdünnt verwendet. Als sekundärer Ak wurde α -Maus IgG/IgM AP verwendet.

Da IsaA nicht der SERAM-Gruppe zugerechnet wird, wurde auf eine weitere Charakterisierung dieses von mAk A198F3 (α -IsaA) verzichtet.

3.1.5 Monoklonaler Antikörper A97D6 (α -Glycerolesterhydrolase)

Der monoklonale Antikörper A97D6 bindet in einem *Testblot* ein Protein in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 85 kDa (vgl. Abbildung 3.7). Zur Identifizierung des entsprechenden Antigens wurde wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben vorgegangen. Das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse ergab als wahrscheinlichstes Protein die Glycerolesterhydrolase (Lipase) (Abbildung 3.7).

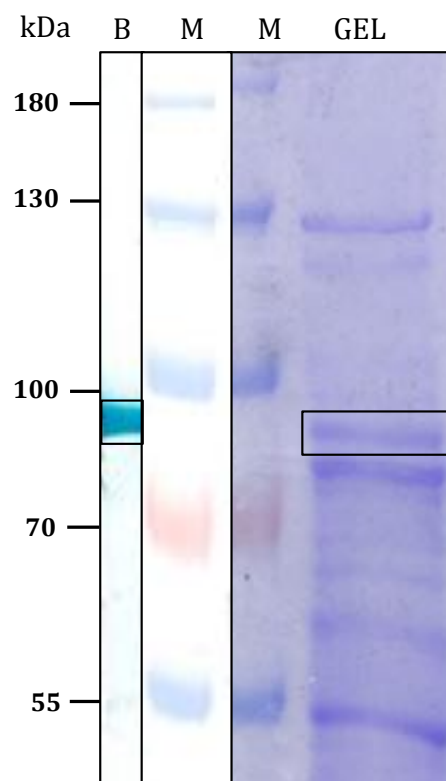


Abbildung 3.7: mAk A97D6: α -Lip-Immunoblot und SDS-PAGE

Zur Identifizierung des von mAk A97D6 gebundenen Proteins wurde wie in Abbildung 3.6 beschrieben vorgegangen. In einer 8 % SDS-PAGE wurden TCA-gefällte *S. aureus* Newman-Kulturüberstandsproteine aus ca. 4 ml Flüssigkultur aufgetrennt (GEL). Der Immunoblot (B) wurde nach der in Abschnitt 2.16.3.4 beschriebenen Methode gefärbt und entwickelt. Der Rahmen in der SDS-PAGE (GEL) markiert die aus dem Gel ausgeschnittene und mittels MALDI-TOF analysierte Proteinbande. Top-Resultat dafür war die Glycerolesterhydrolase (Lip). M: Markerproteine in kDa.

mAk A97D6 bindet eine weitere Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 35 kDa, die im entsprechenden *Immunoblot*-Ausschnitt nicht dargestellt ist. Dabei könnte es sich um ein Abbauprodukt der Glycerolesterhydrolase (Lip) handeln. Da auch die Glycerolesterhydrolase (Lipase) kein Protein der SERAM-Gruppe ist, wurde mAk A97D6 keiner genaueren Analyse unterzogen.

3.1.6 Weitere monoklonale Antikörper

Aus der ersten Fusion (A) wurden weitere monoklonale Antikörper generiert, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer charakterisiert wurden.

3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen rekombinante SERAMs (Coa, vWbp, Efb)

In einem ersten Ansatz wurden zur Immunisierung der BALB/c-Mäuse TCA-gefällte Kulturüberstandspoteine des Stammes *Staphylococcus aureus* Newman verwendet (vgl. 3.1.1). Wie bereits dargestellt, können Art und Umfang der damit generierten Antikörper erheblich variieren. Die entsprechenden Antigene müssen im Nachhinein identifiziert werden (vgl. Abschnitte 3.1.3.1, 3.1.4 und 3.1.5). Um gezielt monoklonale Antikörper gegen interessierende Antigene herzustellen, können entsprechende Proteine auch rekombinant produziert und für die Immunisierung der BALB/c-Mäuse verwendet werden. In dieser Arbeit wurden dazu die SERAMs Coa, vWbp, Efb hergestellt. Das rekombinant produzierte Emp konnte nicht in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden, sodass dieses Protein nicht zur Immunisierung verwendet wurde. Es konnte jedoch zur Bestätigung der Spezifität von mAk A214C9 (vgl. 3.1.3.1) eingesetzt werden.

3.2.1 Herstellung rekombinanter Proteine (Coa, vWbp, Emp, Efb, Eap)

Die Herstellung der rekombinanten Proteine Coa, vWbp, Emp und Efb erfolgte nach der in Abschnitt 2.19 beschriebenen Methode. Coa, vWbp und Efb konnten in quantitativ ausreichenden Mengen produziert und aufgereinigt werden, sodass diese für eine anschließende Immunisierung geeignet waren. Emp konnte trotz mehrerer Optimierungsversuche nicht in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden, sodass es für eine anschließende Immunisierung nicht verwendet wurde.

3.2.1.1 Herstellung von rekombinanter Staphylokoagulase (Coa)

Im Folgenden sind die Schritte der Herstellung der rekombinanten Staphylokoagulase (Coa) dargestellt.

3.2.1.1.1 Klonierung von *coa* (NWNM_0166) in pET-28a

Die PCR zur Amplifikation des *coa*-Fragmentes wurde nach dem in Abschnitt 2.17.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Polymerase *DreamTaq* von Fermentas (vgl. Tabelle 2.7) unter folgendem Reaktionsprogramm eingesetzt: 3 min bei 94 °C, 35 x (30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 50 °C, 75 sec bei 72 °C), 10 min 72 °C. Als *Primer* wurden die Oligonukleotide „Coa_for_BamHI_2“ und „Coa_rev_SalI_2“ verwendet (vgl. Tabelle 2.8). Der amplifizierte Genabschnitt mit den *Primer*-Bindestellen ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Im *Primer* „Coa_for_BamHI_2“ findet sich neben der Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BamHI auch noch eine Schnittstelle, die für Faktor_Xa kodiert. Diese kann nach Aufreinigung des rekombinanten Proteins optional zur enzymatischen Entfernung des (His)₆-Tags verwendet werden. Da eine direkte Klonierung von „BamHI/SalI“-verdauten PCR-Produkten erfolglos blieb, wurden die PCR-Amplifikate in einen Zwischenvektor TA-kloniert (Vektor pSC-A-amp/kan, vgl. 2.17.6.2). Das daraus durch „BamHI/SalI“-Verdau gewonnene DNA-Fragment konnte erfolgreich in den Zielvektor pET-28a kloniert werden (vgl. 2.17.9, Ligationsansatz: 3 µl Vektor, 14 µl Passagier-DNA, 2 µl Ligase-Puffer, 1 µl Ligase, 0,2 µl ATP, Inkubation bei 16 °C über Nacht). Nach einer positiven *Screening*-PCR (vgl. 2.17.2) und einem erfolgreichen Probeverdau des rekombinanten Plasmids, bei dem ein DNA-Fragment der erwarteten Größe aus dem Vektor ausgeschnitten werden konnte, wurde die Korrektheit der Sequenz und Ligation durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (vgl. 2.17.11). Das somit hergestellte Plasmid pET-28a_coa (vgl. Tabelle 2.9) wurde nach Aufreinigung in den elektrokompenten Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformiert (vgl. 2.17.5.3, Tabelle 2.5 und Abbildung 3.8).

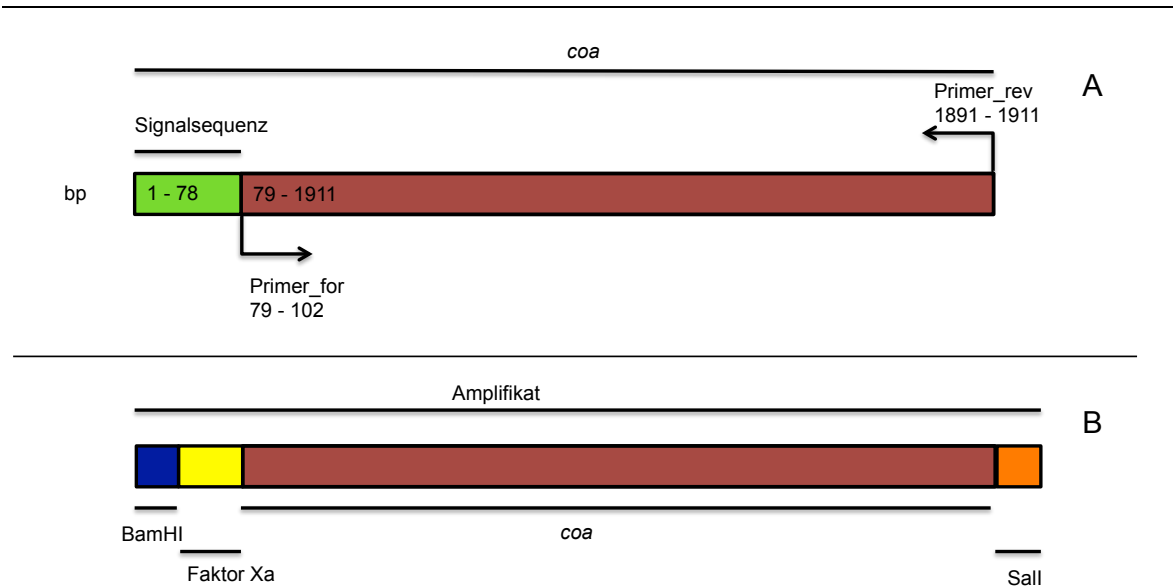


Abbildung 3.8: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation von *coa*

Schematische Darstellung des *coa*-Gens mit den Primer-Bindestellen (A). Amplifiziert wurde das gesamte Gen exklusive der Signalsequenz (siehe Primer-Bindestellen). In B ist das entsprechende Amplifikat dargestellt. Es enthält Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und Sall, sowie eine Schnittstelle für Faktor Xa. Über die Restriktionsstellen für BamHI und Sall wurde das Amplifikat in die MCS (Multiple cloning site) des Expressionsvektors pET-28a ligiert. *Primer_for*: „Coa_for_BamHI_2“; *Primer_rev*: „Coa_rev_Sall_2“ bp: Basenpaar.

3.2.1.1.2 Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Staphylokoagulase (Coa)

Nach der erfolgreichen Produktionsanalyse (vgl. Abbildung 3.9) wurde mit der Induktion größerer Kulturvolumina begonnen (detaillierte Darstellung in Abschnitt 2.19.3). 5 ml LB-Übernachtskultur (50 µg/ml Kanamycin) des zuvor transformierten Expressionsstammes wurden zu 200 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) gegeben und nach 2 h Inkubation (37 °C, 180 rpm) mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 2 h Inkubation wurde die Kultur abzentrifugiert. Der Aufschluss des Zellsediments erfolgte durch Applikation von Ultraschallpulsen. Die chromatographische Aufreinigung der rekombinanten Coa-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. 2.19.4 und Abbildung 3.10).

ERGEBNISSE

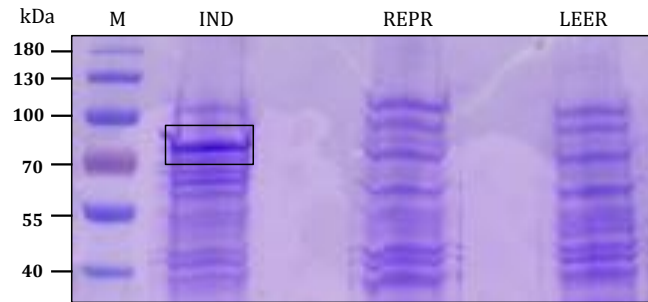


Abbildung 3.9: Produktionsanalyse von Coa (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

Die Gesamtzelllysate wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Aufgetragen wurden je 10 μ l. IND: induzierte Kultur (1 mM IPTG), REPR: reprimierte Kultur (2 % Glucose), LEER: nicht induzierte Kultur. Wie bei einer erfolgreichen Expression zu erwarten, konnte im Gesamtzelllysate der induzierten Kultur eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von ca. 72 kDa (Coa, schwarz umrahmt) identifiziert werden, die bei den reprimierten bzw. nicht-induzierten Kulturen nicht nachweisbar war. M: Markerproteine in kDa.

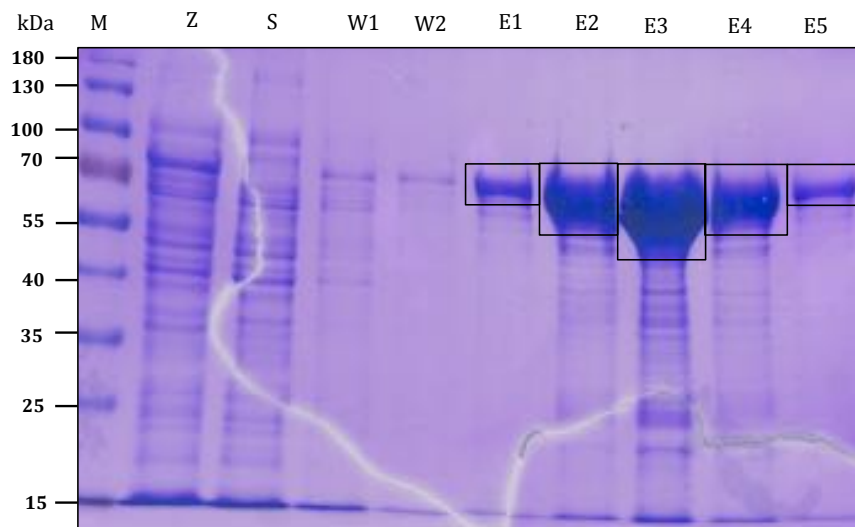


Abbildung 3.10: Aufreinigung der rekombinanten Coa (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)

Die in der 12 % SDS-PAGE aufgetrennten Proben (je 10 μ l + 10 μ l 2 x SDS-Probenpuffer) entsprechen den Schritten der Aufreinigung (vgl. 2.19.4). M: Markerproteine in kDa. Z: Überstand nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen. S: Überstand nach Säulendurchlauf. W1: Durchlauf des 1. Waschschr. 2. W2: Durchlauf des 2. Waschschr. 2. E1 – E5: Elutionsschritte 1 – 5. Schwarz umrahmt sind die jeweiligen Coa-Proteinbanden. M: Markerproteine in kDa.

3.2.1.2 Herstellung von rekombinantem von Willebrand-Faktor-Bindeprotein (vWbp)

Im Folgenden sind die Schritte der Herstellung des rekombinanten vWbp im Detail dargestellt.

3.2.1.2.1 Klonierung von *vwbp* (NWMN_0757) in pET-28a

Die initiale PCR zur Amplifikation des *vwbp*-Fragmentes wurde nach dem in Abschnitt 2.17.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Im entsprechenden Ansatz wurde die DNA-Polymerase *High Fidelity* von Roche verwendet (vgl. Tabelle 2.7). Als *Primer* wurden die Oligonukleotide „vWbp_BamHI_factorXa_F“ und „vWbp_Sall_R“ eingesetzt (vgl. Tabelle 2.8). Ersterer (*Vorwärts-Primer*) kodiert zusätzlich für eine Faktor Xa-Schnittstelle (Abbildung 3.11). Da *vwbp* nicht direkt in den Zielvektor (pET-28a) kloniert werden konnte, wurde das entsprechende PCR-Produkt zunächst in einen Zwischenvektor ligiert (pCR®2.1TOPO, vgl. 2.17.6.1). Aus diesem konnte das *vwbp*-Fragment durch Restriktionsverdau isoliert werden (vgl. 2.17.8.1) und anschließend in den Expressionsvektor pET-28a ligiert werden (vgl. 2.17.9). Das somit hergestellte Plasmid „pET-28a_vwbp“ wurde nach erfolgreicher *Screening*-PCR (vgl. 2.17.2) und Probeverdau durch Sanger-Sequenzierung (vgl. 2.17.11) in der Korrektheit bestätigt. Das Plasmid wurde in elektrokompente *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformiert (vgl. 2.17.5.3 und Tabelle 2.5).

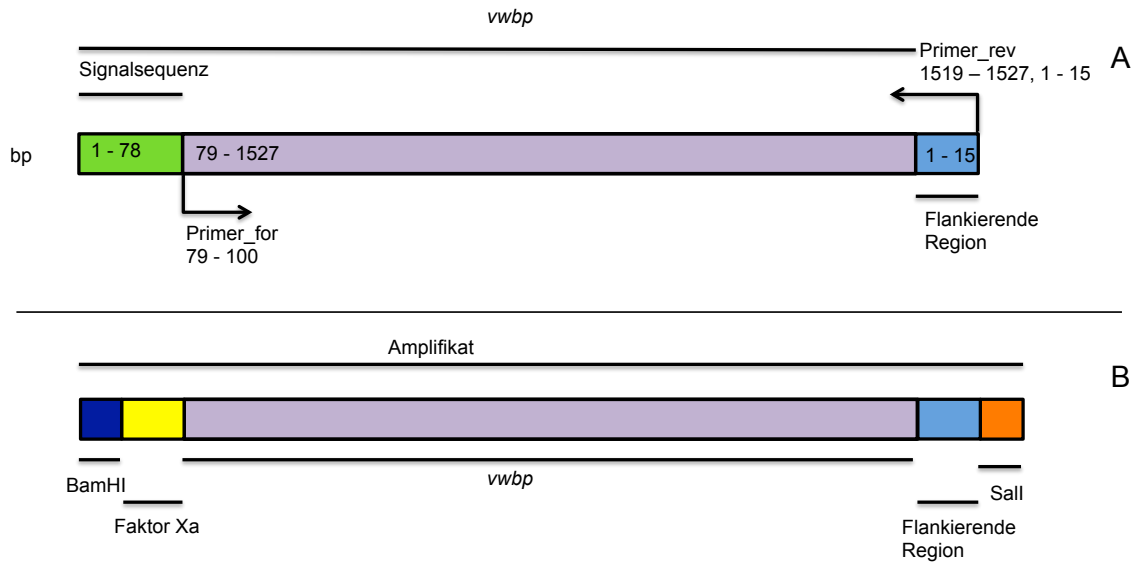


Abbildung 3.11: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation von *vwbp*

Schematische Darstellung des *vwbp*-Gens mit den Primer-Bindestellen (A). Amplifiziert wurde das gesamte Gen exklusive der Signalsequenz (siehe Primer-Bindestellen). In B ist das entsprechende Amplifikat dargestellt. Es enthält Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und Sall, sowie eine Schnittstelle für Faktor Xa. Über die Restriktionsstellen für BamHI und Sall wurde das Amplifikat in die MCS (Multiple cloning site) des Expressionsvektors pET-28a ligiert. Primer_for: „*vwbp*_BamHI_factorXa_F“; Primer_rev: „*vwbp*_Sall_R“. bp: Basenpaar.

3.2.1.2.2 Produktion und Aufreinigung von rekombinantem vWbp

Vor der Expression und Aufreinigung größerer Mengen des rekombinanten vWbp mussten die entsprechend transformierten Stämme auf ihre Expressionsfähigkeit hin getestet werden (vgl. Abbildung 3.12). Dazu wurden je 5 ml LB-Kulturen drei verschiedener Kolonien mit 0,1 M IPTG induziert. Als Negativkontrolle wurde die Kultur einer Kolonie mit 2 % Glucose (w/v) reprimiert. Wie im folgenden SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) (Abbildung 3.12) dargestellt, konnte bei allen induzierten Kulturen eine Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden. Bei der Negativkontrolle war diese nicht nachweisbar.

ERGEBNISSE

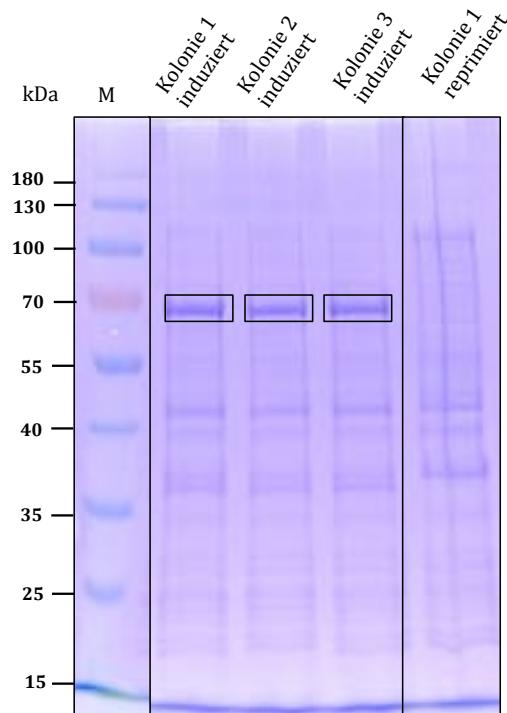


Abbildung 3.12: Produktionsanalyse des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

Zur Produktionsanalyse wurden je 1 ml der induzierten bzw. reprimierten Kulturen zentrifugiert. Das Sediment wurde 1 x SDS-Probenpuffer ($OD_{600} \times 0,2 = \text{Volumen in ml}$) resuspendiert und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Davon wurden je 10 µl in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Bei allen drei induzierten Kulturen zeigte sich eine deutliche Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich (schwarzer Rahmen). In der mit 2 % Glucose reprimierten Kultur war keine entsprechende Bande nachweisbar. Die Expression des rekombinanten vWbp konnte somit als erfolgreich gewertet werden. M: Markerproteine in kDa.

Das Verfahren der quantitativen Aufreinigung des produzierten Proteins hängt von dessen Löslichkeit ab. Nach der erfolgreichen Produktionsanalyse wurde deshalb ein Löslichkeitstest durchgeführt (vgl. 2.19.2). Dieser klärt die Frage, ob sich das entsprechende Protein in der löslichen oder unlöslichen Fraktion findet (z. B. *Inclusion bodies*). Das Ergebnis des Tests ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Unter den im Test gewählten Induktionsbedingungen fand sich das rekombinante vWbp zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion.

ERGEBNISSE

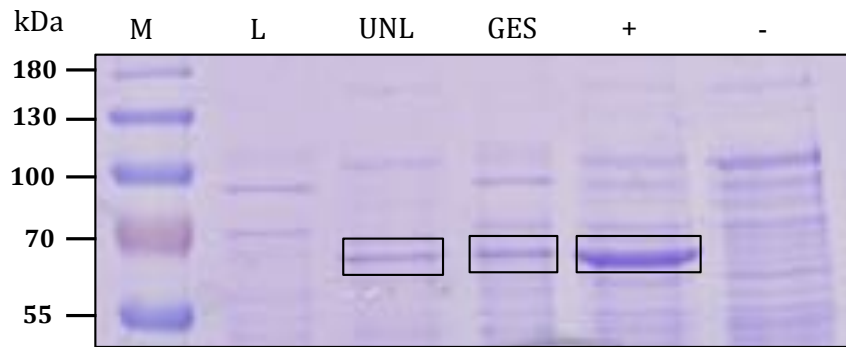


Abbildung 3.13: Löslichkeitstest des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Aufgetragen wurden je 10 µl. Positiv- und Negativkontrolle (+ und -) wurden zur Identifizierung der korrekten Bande mit aufgetragen (dazu wurden die induzierten bzw. reprimierten Proben aus der vorangegangenen Produktionsanalyse (vgl. Abbildung 3.12) verwendet). Nach dem Test konnte eine Bande der gleichen Größe in der unlöslichen Fraktion (UNL) und im Gesamtzelllysat (GES) identifiziert werden (schwarz umrahmt). In der löslichen Fraktion (L) fand sich in diesem Bereich keine bzw. eine schwache Proteinbande. M: Markerproteine in kDa.

Um auszuschließen, dass die Löslichkeit des Proteins durch die Induktionsbedingungen eingeschränkt war, wurde der Löslichkeitstest unter verschiedenen Bedingungen wiederholt. Dabei wurden die Empfehlungen aus dem QiaExpressionist „Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins“, 5. Auflage, Juni 2013 von Qiagen) berücksichtigt. Danach kann die Löslichkeit des Proteins durch Temperatur, Wachstumsphase (Zeit) und Konzentration an IPTG beeinflusst werden.

Tabelle 3.1: Induktionsbedingungen im Löslichkeitstest von vWbp

Bedingung (Nr.)	Temperatur (°C)	Zeit (min)	IPTG (mM)
1	37	30	1
2	27	120	1
3	27	120	0,1
4	15	960	0,01
5	15	960	0,1
6	15	960	1

Nach der Auftrennung und Analyse der entsprechenden Proben mittels SDS-PAGE (nicht gezeigt) ergab sich bezüglich der Löslichkeit visuell kein eindeutiger Vorteil für eine der getesteten Bedingungen. Unter allen war der Anteil des Proteins in der löslichen Fraktion wesentlich kleiner als im entsprechenden unlöslichen Anteil. Da jedoch in der

ERGEBNISSE

jeweiligen löslichen Fraktion immer ein kleiner Anteil des exprimierten Proteins nachgewiesen werden konnte, war zu erwarten, dass bei Anpassung des Kulturvolumens auch eine ausreichend große Menge des exprimierten Proteins in der löslichen Phase aufgereinigt werden konnte. Das detaillierte Protokoll zur nachfolgenden Expression und Aufreinigung findet sich den Abschnitten 2.19.3 und 2.19.4. 200 ml Kultur wurden dazu nach 2 h 15 min bei 37 °C mit 0,1 mM IPTG induziert und für 2 h 10 min bei 27 °C inkubiert. In der folgenden SDS-PAGE ist das Ergebnis der Aufreinigung dargestellt. (Abbildung 3.14).

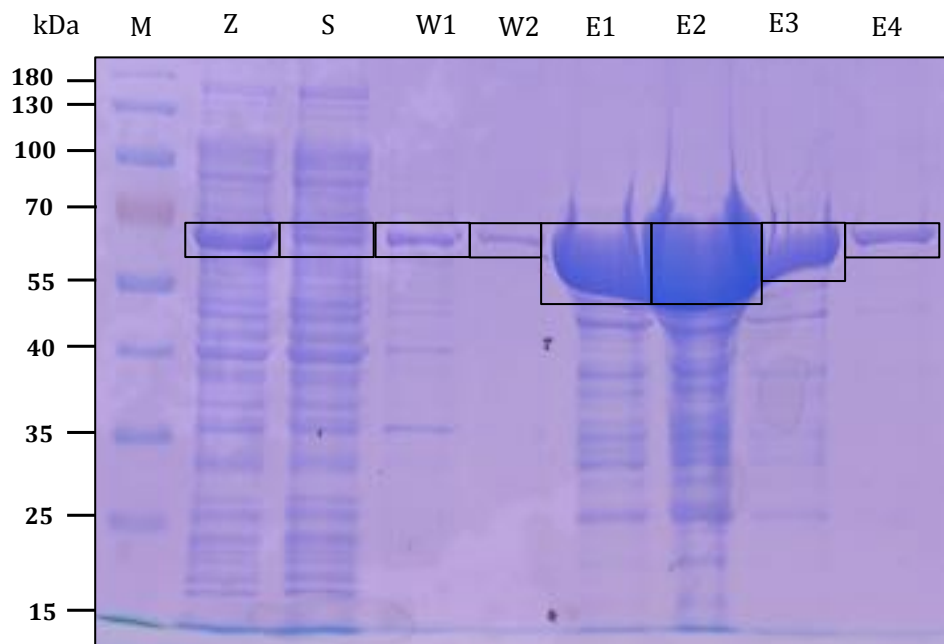


Abbildung 3.14: Aufreinigung des rekombinanten vWbp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)

Die in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennten Proben (je 10 µl + 10 µl 2x SDS-Probenpuffer) entsprechen den Schritten der Aufreinigung (vgl. 2.19.4). M: Markerproteine in kDa. Z: Überstand nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen. S: Überstand nach Säulendurchlauf. W1: Durchlauf des 1. Waschschriffes. W2: Durchlauf des 2. Waschschriffes. E1 – E4: Elutionsschritte 1 – 4. Schwarz umrahmt sind die jeweiligen vWbp-Proteinbanden.

Mit einem α -His-Blot (vgl. 2.16.3.5) konnte durch Nachweis des (His)₆-Tags bestätigt werden, dass es sich bei dem eluierten Protein um das exprimierte, rekombinante vWbp handelte (Abbildung 3.15).

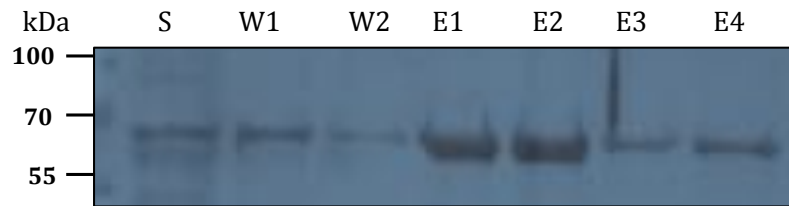


Abbildung 3.15: α -(His)₆-vWbp-Immunoblot

Die Proben entsprechen in Volumen und Verarbeitung denen aus Abbildung 3.14. Die Proben E1 – E4 wurden zuvor 1:10 verdünnt. Die Auftrennung erfolgte in einer 12 % SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit α -(His)₆ nachgewiesen. Zur Detektion wurde der Röntgenfilm 30 sec belichtet und anschließend entwickelt.

3.2.1.3 Herstellung von rekombinantem Extrazellulären Matrix-Bindeprotein (Emp)

Im Folgenden sind die Schritte der Klonierung, Expression und Aufreinigung des rekombinanten Emp im Detail dargestellt.

3.2.1.3.1 Klonierung von *emp* (NWMN_0758) in pET-28a

Die Amplifikation des *emp*-DNA-Fragmentes wurde wie in Abschnitt 2.17.2 beschrieben durchgeführt (Abbildung 3.16). Verwendet wurden dazu die Oligonukleotide „Emp_BamHI_factorXa_F“ und „Emp_Sall_R“ (vgl. Tabelle 2.8). Als DNA-Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase *DreamTaq* von Fermentas verwendet (vgl. Tabelle 2.7). Das PCR-Reaktionsprogramm wurde wie folgt eingestellt: 3 min bei 94 °C, 35 x (30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 60 °C, 75 sec bei 72 °C), 10 min bei 72 °C. Da eine direkte Klonierung der verdauten PCR-Fragmente in den Expressionsvektor (pET-28a) nicht erfolgreich war, wurde der Umweg über den Zwischenvektor pSC-A-amp/kan gewählt (vgl. Tabelle 2.9 und 2.17.6.2). Aus diesem Vektor konnte das *emp*-DNA-Fragment durch „BamHI/Sall“-Verdau (vgl. 2.17.8.1) gewonnen und in den Zielvektor pET-28a kloniert werden (vgl. 2.17.9). Die Korrektheit der Ligation und Sequenz wurden durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (vgl. 2.17.11). Das damit hergestellte Plasmid pET-28a_emp (vgl. Tabelle 2.9) wurde in den elektrokompenten Expressionsstamm „*E. coli* BL21 (DE3) pLys“ transformiert (vgl. 2.17.5.3 und Tabelle 2.5).

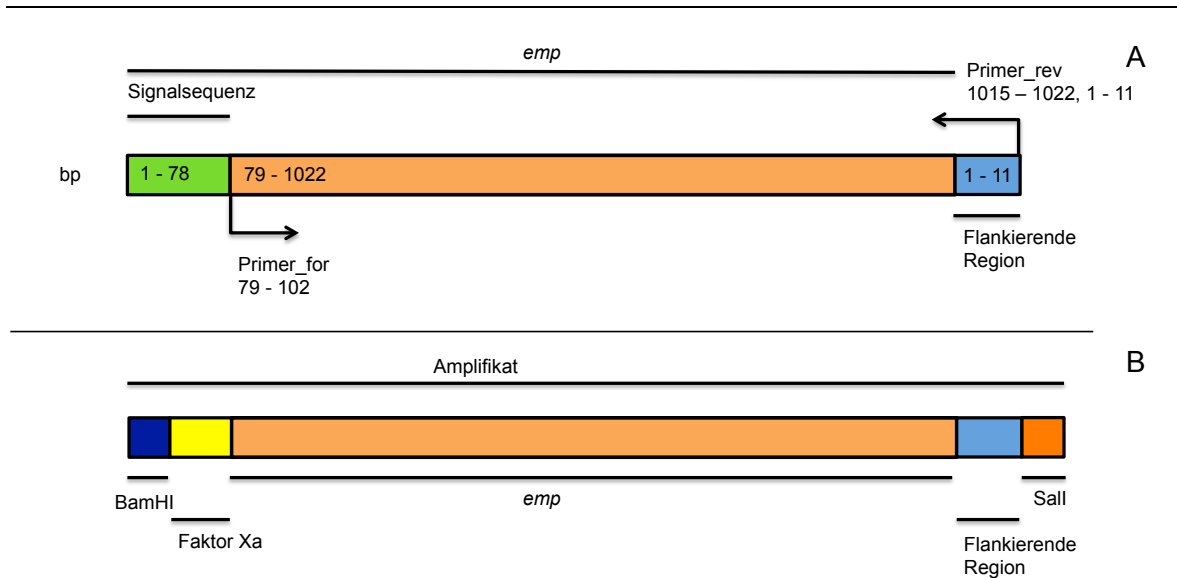


Abbildung 3.16: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation von *emp*

Schematische Darstellung der PCR-Primer (A) und des Amplifikates (B) von *emp*. *Primer_for*: Vorwärtsprimer (*Emp_BamHI_factorXa_F*), *Primer_rev*: Rückwärtsprimer (*Emp_Sall_R*). Die Signalsequenz (bp 1 – 78) wurde von der Amplifikation ausgeschlossen. Neben den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *Sall* enthält es noch eine 11 bp große Sequenz der flankierenden Region, sowie die Erkennungssequenz für Faktor Xa.

3.2.1.3.2 Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Emp

Die Produktionsanalyse von Emp zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Lysaten der induzierten und reprimierten bzw. nicht induzierten Kulturen (vgl. Abbildung 3.17), sodass zunächst unklar war, ob eine Expression des rekombinanten Emp überhaupt möglich war. Da keine der Proteinbanden im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) eindeutig dem Zielprotein zugeordnet werden konnte, wäre auch ein anschließender Löslichkeitstest nicht sinnvoll gewesen. Um auszuschließen, dass die Produktionsanalyse aufgrund einer zu geringen Genexpression nicht interpretierbar war, wurde die induzierte Transkriptionsphase fortgesetzt (vgl. 2.19.3 und 2.19.4). Im Rahmen der Aufreinigung war damit eine Isolierung geringer Mengen des Zielproteins (Emp) möglich.

ERGEBNISSE

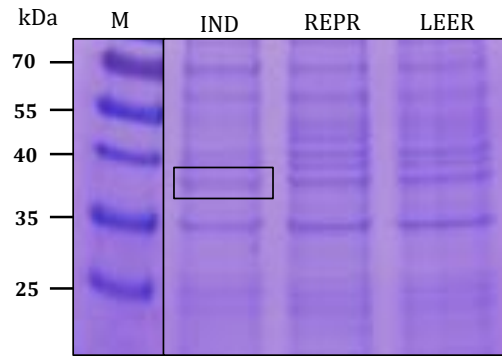


Abbildung 3.17: Produktionsanalyse von Emp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im Molekulargewichtsbereich von Emp (ca. 38 kDa, schwarzer Rahmen) zeigte sich bei der induzierten Kultur (IND) im Vergleich zu der reprimierten (2 % Glucose) (REPR) und nicht induzierten Kultur (LEER) keine eindeutige Proteinbande, die auf eine ausreichende Expression des rekombinanten Proteins hindeutete.

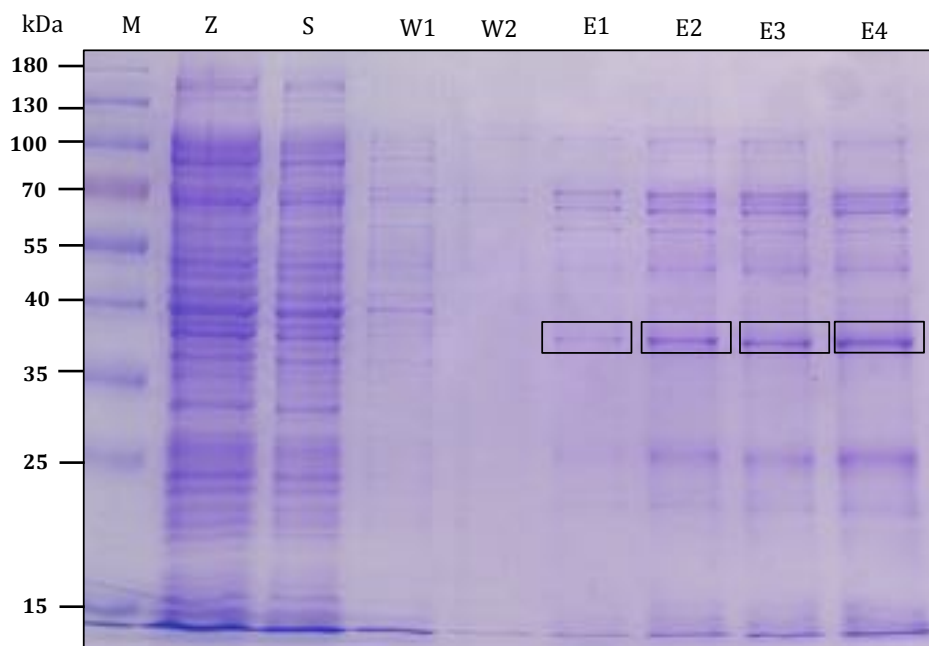


Abbildung 3.18: Säulenchromatographische Aufreinigung von Emp (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)

Die in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennten Proben (je 10 μ l + 10 μ l 2 x SDS-Probenpuffer) entsprechen den Schritten der Aufreinigung (vgl. 2.19.4). Z: Überstand nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen. S: Überstand nach Säulendurchlauf. W1: Durchlauf des 1. Waschschr. W2: Durchlauf des 2. Waschschr. E1 – E4: Elutionsschritte 1 – 4. Schwarz umrahmt sind die jeweiligen Emp-Proteinbanden. Auch nach der 4. Elution (E4) fanden sich in der Probe neben Emp noch zahlreiche andere Proteine. Aufgrund der geringen Menge des aufgereinigten Proteins bei gleichzeitig geringer Reinheit, wurde diese Fraktion nicht zur Immunisierung verwendet.

Zur Bestätigung, dass es sich bei der mutmaßlichen Emp-Proteinbande auch tatsächlich um das rekombinante Zielprotein handelte, wurde ein α -His-*Immunoblot* durchgeführt (vgl. 2.16.3.5). Der (His)₆-*Tag* war im mutmaßlichen Zielprotein nachweisbar (*Immunoblot* nicht gezeigt).

3.2.1.4 Herstellung des rekombinanten Fibrinogen Binde-Proteins (Efb)

Im Folgenden sind die Schritte der Klonierung, Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Efb im Detail dargestellt.

3.2.1.4.1 Klonierung von *efb* (NWMN_1069) in pET-28a

Für die PCR (vgl. 2.17.2) des *efb*-DNA-Fragmentes wurden die *Primer* „Fib_for_BamHI“ und „Fib_rev_SalI“ verwendet (Abbildung 3.19). Die Synthese erfolgte durch die *Taq*-Polymerase *DreamTaq* von Fermentas (vgl. Tabelle 2.7) unter folgendem Reaktionsprogramm: 3 min bei 94 °C, 35 x (30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 60 °C, 120 sec bei 72 °C), 10 min bei 72 °C. Die „BamHI/SalI“-verdauten PCR-Amplifikate konnten direkt in den Zielvektor pET-28a kloniert werden (vgl. 2.17.9). Der parallel durchgeführte Weg über den Zwischenvektor pSC-A-amp/kan (vgl. Tabelle 2.9 und 2.17.6.2) war ebenfalls erfolgreich. Die Korrektheit der Ligation und Sequenz des damit gewonnenen Vektors pET-28a_efb wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (vgl. 2.17.11). Das Plasmid wurde in den elektrokompenten Expressionsstamm „*E. coli* BL21 (DE3) pLys“ transformiert (vgl. 2.17.5.3 und Tabelle 2.5).

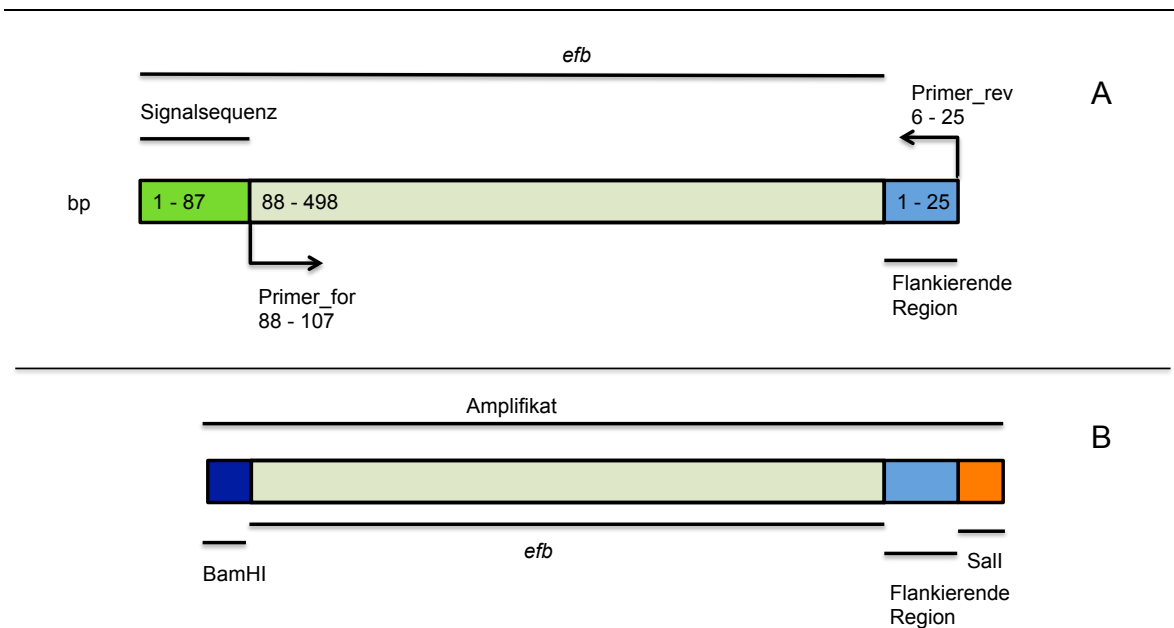


Abbildung 3.19: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation von *efb*

Schematische Darstellung der PCR-Primer (A) und des entsprechenden Amplifikates (B) von *efb*. Primer_for: Vorwärtsprimer („Fib_for_BamH“I, vgl. Tabelle 2.8), Primer_rev: Rückwärtsprimer („Fib_rev_Sall“, vgl. Tabelle 2.8). Die Signalsequenz (bp 1-87) wurde von der Amplifikation ausgeschlossen. Das Amplifikat enthält neben der Sequenz für *efb* die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und Sall, mittels derer die Ligation in die MCS des Zielvektors erfolgte.

3.2.1.4.2 Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Efb

Nach der erfolgreichen Produktionsanalyse (vgl. Abbildung 3.20) wurde ohne Löslichkeitstest mit der Induktion und Aufreinigung fortgefahren (vgl. 2.19.3, 2.19.4 und Abbildung 3.21).

ERGEBNISSE

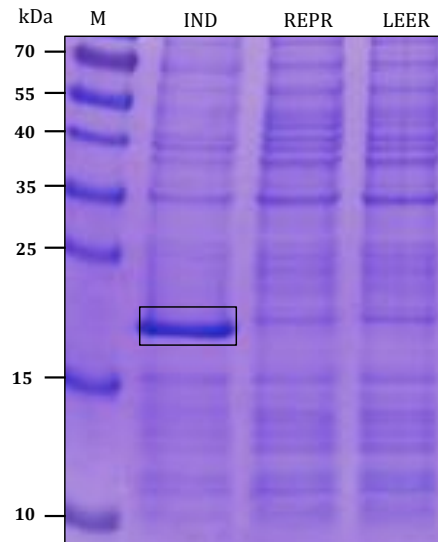


Abbildung 3.20: Produktionsanalyse des rekombinanten Efb (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

Die Proben wurden in einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das Lysat der induzierten Kultur (IND) zeigte eine deutliche Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 19 kDa (schwarz umrahmt), die bei den Lysaten der reprimierten (REPR) und nicht induzierten (LEER) Kulturen nicht nachweisbar war. Die Produktionsanalyse war somit als erfolgreich zu werten. M: Markerproteine in kDa.

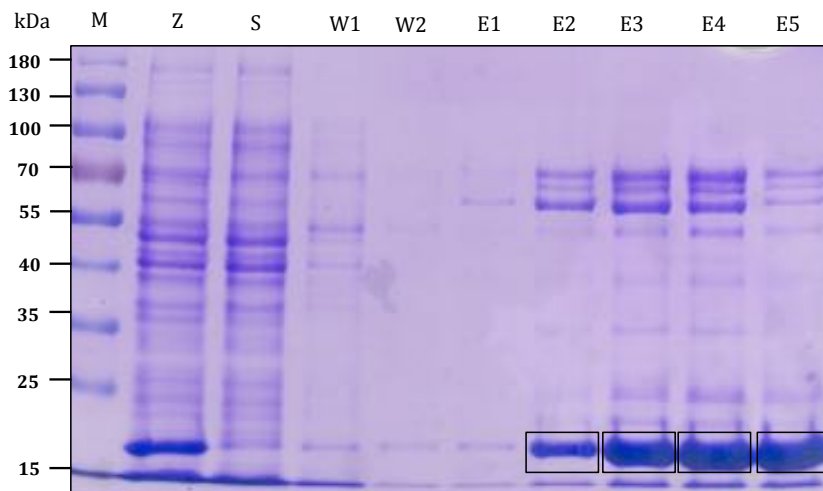


Abbildung 3.21: Säulenchromatographische Aufreinigung des rekombinanten Efb (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)

Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Sie entsprechen in Verarbeitung und aufgetragenem Volumen den Proben aus Abbildung 3.14. Das Zielprotein (Efb) ist jeweils schwarz umrahmt. M: Markerproteine in kDa.

Mit einem α -His-Immunoblot (vgl. 2.16.3.5) konnte am Zielprotein (Efb) der (His)₆-Tag nachgewiesen und damit die Identität bestätigt werden (Immunoblot nicht gezeigt).

3.2.1.5 Herstellung des rekombinanten Extrazellulären Adhärenzproteins (Eap)

Im Folgenden ist die Klonierung, Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Eap im Detail dargestellt.

3.2.1.5.1 Klonierung von *eap* (NWMN_1872) in pET-28a

Für die PCR (vgl. 2.17.2) des *eap*-Fragmentes wurden die *Primer* „Map_for_BamHI“ und „Map_rev_SalI“ verwendet (vgl. Tabelle 2.8 und Abbildung 3.22). Die Synthese erfolgte durch die *Taq*-Polymerase *DreamTaq* von Fermentas (vgl. Tabelle 2.7) unter folgendem Reaktionsprogramm: 3 min bei 94 °C, 35 x (30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 60 °C, 120 sec bei 72 °C), 10 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt wurde in den Zwischenvektor pSC-A-amp/kan kloniert (vgl. Tabelle 2.9 und 2.17.6.2). Die aus diesem Vektor durch Restriktionsverdau gewonnene Passagier-DNA konnte daraufhin erfolgreich in die MCS des Zielvektors pET-28a kloniert werden (vgl. 2.17.9). Die Korrektheit der Ligation und Sequenz des damit gewonnenen Vektors „pET-28a_eap“ wurde durch Sanger-Sequenzierung überprüft (vgl. 2.17.11). Das Plasmid wurde in den elektrokompenten Expressionsstamm „*E. coli* BL21 (DE3) pLys“ transformiert (vgl. 2.17.5.3 und Tabelle 2.5).

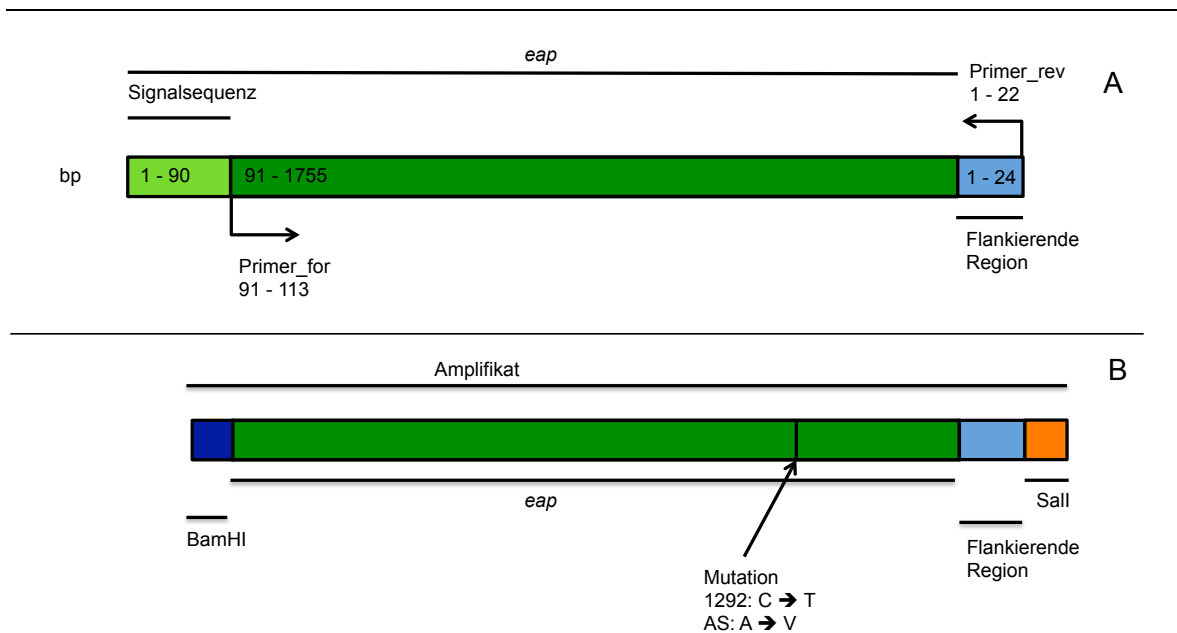


Abbildung 3.22: Darstellung der PCR-Primer und Amplifikation des *eap*-Gens

Schematische Darstellung der PCR-Primer (A) und des entsprechenden Amplifikates (B) des *eap*-Gens. Primer_for: Vorwärtsprimer (Map_for_BamHI, vgl. Tabelle 2.8), Primer_rev: Rückwärtsprimer (Map_rev_Sall, vgl. Tabelle 2.8). Die Signalsequenz (bp 1-90) wurde von der Amplifikation ausgeschlossen. Das Amplifikat enthält neben der Sequenz für *eap* die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und Sall, mittels derer die Ligation in die MCS des Zielvektors (pET-28a) erfolgte. Die zusätzlich im PCR-Produkt enthaltene 24 bp große Sequenz der flankierenden Region kommt bei der folgenden Expression des Proteins nicht zum Tragen, da die Translation vorher durch das Stopcodon unterbrochen wird. Die Sequenzierung des Konstrukts pET-28a_*eap* zeigte eine Mutation (Cytosin zu Thymin) an Position 1292 des *eap*-Gens. Damit änderte sich die kodierte Aminosäure (AS) von Alanin zu Valin.

3.2.1.5.2 Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Eap

Mit der Produktionsanalyse des rekombinanten Eap konnte kein eindeutiger Erfolg der Produktion nachgewiesen werden (SDS-PAGE nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass das Protein nur in Spuren vorliegt, wurde mit der Produktion und Aufreinigung größerer Mengen fortgefahren (vgl. 2.19.3 und 2.19.4). Im erwarteten Molekulargewichtsbereich zeigte sich in den Fraktionen E2 – E5 eine Doppelbande (vgl. Abbildung 3.23). Um zu klären, bei welcher der Banden es sich um das rekombinante Eap handelte, wurde ein α -His-Immunoblot durchgeführt (vgl. 2.16.3.5). In diesem Blot war Eap aufgrund zu vieler unspezifischer Reaktionen nicht eindeutig identifizierbar. Aus zeitlichen Gründen wurde auf aufwendige Optimierungsversuche der Aufreinigung verzichtet und das rekombinante Eap nicht für eine Immunisierung verwendet.

ERGEBNISSE

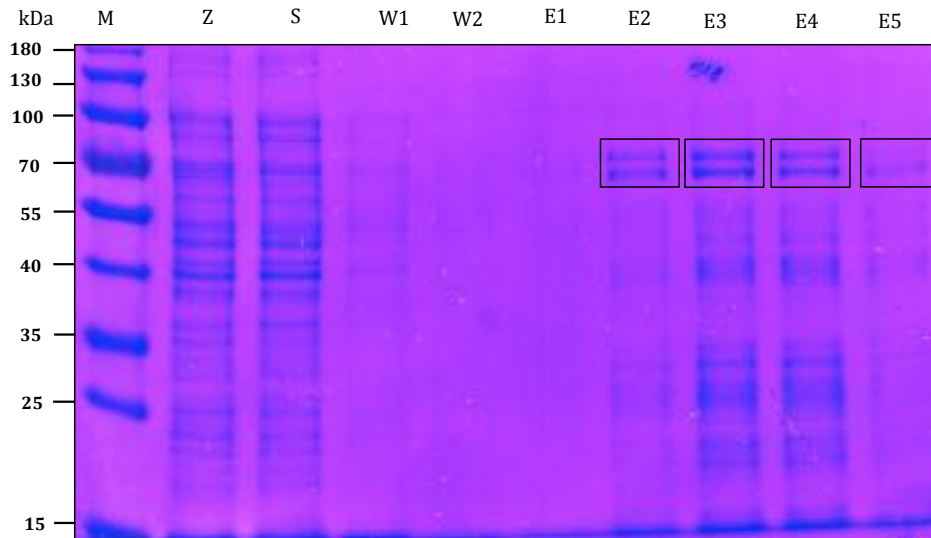


Abbildung 3.23: Säulenchromatographische Aufreinigung des rekombinanten Eap (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE gezielter Fraktionen)

Die in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennten Proben (je 10 µl + 10 µl 2x SDS-Probenpuffer) entsprechen den Schritten der Aufreinigung (vgl. 2.19.4). Z: Überstand nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen. S: Überstand nach Säulendurchlauf. W1: Durchlauf des 1. Waschschrilles. W2: Durchlauf des 2. Waschschrilles. E1 – E5: Elutionsschritte 1 – 5. Schwarz umrahmt sind die mutmaßlichen Eap-Proteinbanden. Auch nach der 5. Elution (E5) fanden sich in der Probe neben Eap noch zahlreiche weitere Proteine.

3.2.2 Vorbereitung der rekombinanten Antigene für die Immunisierungen von BALB/c-Mäusen

Die Proben aus den Elutionsschritten der höchsten Konzentration des jeweiligen rekombinanten Proteins wurden vereinigt. Vor Verwendung der rekombinanten Antigene für die Immunisierung der BALB/c-Mäuse musste das im Elutionspuffer hochkonzentrierte Imidazol durch Dialyse aus den Proben entfernt werden (vgl. 2.19.5). Danach wurden die Proben erneut mittels SDS-PAGE auf Vorhandensein des entsprechenden Proteins überprüft. Zeitlich bedingt wurden mit den somit gewonnenen rekombinanten Proteinen mehrere Immunisierungen und Fusionen durchgeführt.

3.2.3 Immunisierung mit rekombinantem vWbp

Das aufgereinigte Antigen (vWbp, vgl. 3.2.1.2.2 und 3.2.2) wurde zur Immunisierung entsprechend dem in Abschnitt 2.20.1 beschriebenen Protokoll appliziert.

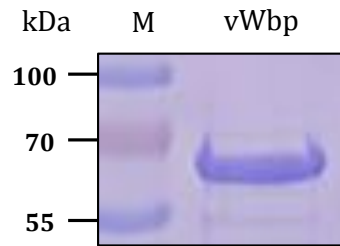


Abbildung 3.24: Aufgereinigtes vWbp nach Dialyse (Coomassie-gefärbte SDS-PAGE)

In einer 12 % SDS-PAGE ist das zur Immunisierung verwendete rekombinante vWbp dargestellt. Aufgetragen wurden ca. 2 µg. M: Markerproteine in kDa.

Auf die Zellfusion (vgl. 2.20.2) folgte nach einer 10-tägigen Selektionsphase (vgl. 2.20.2) das *Screening* der Hybridomazell-Überstände (vgl. 2.20.3). Für jeden *Immunoblot* wurden 3 µg Probe (rekombinantes vWbp, vgl. Abbildung 3.24) verwendet. Das *Screening* der Überstände ergab initial 4 positive Reaktionen. Die positiven Klone wurden nach Expansion erneut auf Antikörperproduktion getestet. Es konnte nur ein positiver Klon identifiziert werden. Um Verwechslungen und methodische Ursachen dieses Ergebnisses auszuschließen, wurden die Klone (inklusive der „benachbarter Wells“ der Testplatten) erneut getestet. Auch eine erneute Expansion der restlichen Zellen aus den ursprünglich positiven *Wells* erbrachte keine Änderung des Ergebnisses. Der einzige positive Klon (B194) konnte bei stabiler Antikörperproduktion expandiert und anschließend kloniert (vereinzelt) werden. Nachdem eine stabil positive Reaktion des Antikörpers gegen rekombinant hergestelltes vWbp nachweisbar war, musste im nächsten Schritt getestet werden, ob der Antikörper auch das entsprechende Epitop des von *S. aureus* Newman sezernierten natürlichen vWbp band. Hierzu wurde in einem *Immunoblot* die Reaktion des Antikörpers mit gefällten Proteinen von *S. aureus* Newman und als Kontrolle mit gefällten Proteinen der Mutante Newman *vwbp emp* getestet (vgl. Tabelle 2.1). Leider konnte keine eindeutige Reaktion des mAk mit einer Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von vWbp (ca. 66 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Eine Erklärung dafür, dass der mAk zwar das rekombinante vWbp erkannte, jedoch nicht das von *S. aureus* sezernierte Protein, könnte sein, dass der Antikörper kein Epitop des natürlichen vWbp erkennt, sondern ein diskontinuierliches „Neoepitop“, das nur im rekombinanten Protein von *E. coli* vorkommt. Es könnte sich aber auch um den (His)₆-Tag oder ein Epitop der Faktor Xa-Schnittstelle handeln. Um dies zu überprüfen, wurde die Reaktivität des mAk mit weiteren, in gleicher Weise produzierten rekombinanten Proteinen getestet (Coa, Efb). Im *Immunoblot* (Abbildung

ERGEBNISSE

3.25) konnte nachgewiesen werden, dass dieser Antikörper neben rekombinantem vWbp auch rekombinante Coa und rekombinantes Efb bindet. Dies erhärtete die Hypothese, dass es sich dabei möglicherweise um einen gegen den (His)₆-Tag oder die Faktor Xa-Schnittstelle gerichteten Ak handelte. Auf eine weitere Charakterisierung des Antikörpers wurde aufgrund dieses Ergebnisses verzichtet.

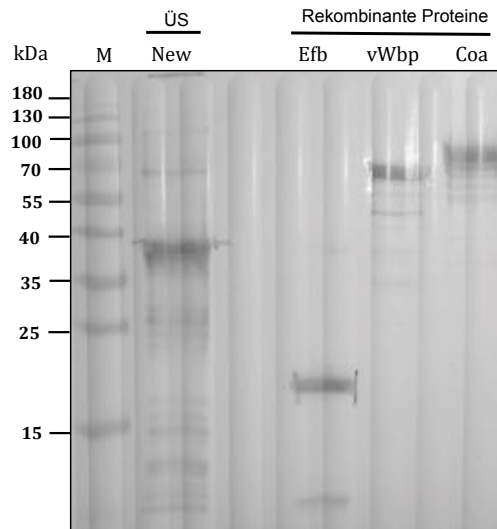


Abbildung 3.25 mAk B194 im Immunoblot

*Test von mAk B194 im Immunoblot. Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons B194 verwendet, als Sekundärantikörper α -Maus IgG/IgM AP. New: Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* Newman aus ca. 5,4 ml Flüssigkulturüberstand. Rekombinante Proteine (je 0,5 μ g): Coa: rekombinante Coa, vWbp: rekombinantes vWbp, Emp: rekombinantes Emp, Efb: rekombinantes Efb. ÜS: Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* Newman. M: Markerproteine in kDa.*

3.2.4 Immunisierung mit rekombinantem Coa, vWbp und Efb

In einem weiteren Versuch wurden die rekombinanten Proteine Coa, vWbp und Efb eingesetzt, wobei 1/3 des entsprechend vorbereiteten Antigens (vgl. 3.2.2) denaturiert (5 min bei 95 °C) wurde und anschließend wieder mit dem nativ belassenen Protein (2/3) vereint wurde. Je 200 μ l der so hergestellten Antigenproben der entsprechenden Antigene (Coa, vWbp, Efb) wurden vereinigt und für die Immunisierung (vgl. 2.20.1) verwendet. Nach Fusion der Milzzellen mit der Myelomzelllinie und Selektionsphase (vgl. 2.20.2) wurden die Überstände, in denen Hybridomazell-Klone identifiziert werden konnten auf Ak-Produktion getestet (vgl. 2.20.3). Zur Herstellung der *Testblots* wurden je ca. 5 μ g rekombinantes Protein (Coa, vWbp, Efb) aus den Proben, die auch zur

Immunisierung verwendet wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Positive Klone wurden expandiert und kryokonserviert (vgl. 2.18.2) oder direkt kloniert (vgl. 2.20.4). Die Klonierung war ad hoc bei drei Klonen erfolgreich. Zwei der Klone waren reaktiv gegen rekombinante Coa und einer gegen rekombinantes Efb.

3.2.4.1 mAk C231D3 (α -Coa)

Klon C231D3 war in der Produktion monoklonaler Antikörper gegen rekombinante Staphylokoagulase (Coa) stabil. Im nächsten Schritt war zu bestätigen, dass das gebundene Epitop spezifisch für Coa ist. Auch hier musste ausgeschlossen werden, dass die Reaktion des Antikörpers auf eine dem rekombinanten Protein angefügte Struktur ((His)₆-Tag oder Faktor Xa-Schnittstelle) zurückzuführen war. In diesem Fall wäre auch eine Reaktion mit weiteren in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteinen (vWbp, Emp, Efb) zu erwarten gewesen. Diese enthielten ebenfalls einen (His)₆-Tag (Efb) oder einen (His)₆-Tag und zusätzlich eine Faktor Xa-Schnittstelle (vWbp, Emp). Wie im folgenden *Immunoblot* dargestellt, war eine Reaktion des mAk nur mit rekombinanter Coa nachweisbar (Abbildung 3.26). Im nächsten Schritt musste gezeigt werden, dass mAk C231D3 neben der rekombinanten Coa auch die von *S. aureus* Newman sezernierte, native Coa spezifisch bindet. Dazu wurden RPMI-Kulturüberstandsproteine des Stammes *S. aureus* Newman TCA-gefällt (vgl. 2.16.4). Als Negativkontrolle wurden Kulturüberstandsproteine der Mutante *S. aureus* Newman *coa* (vgl. Tabelle 2.1) verwendet. Darüber hinaus wurden als weitere Positivkontrolle die Kulturüberstandsproteine der Mutante Newman *vwbp emp* (vgl. Tabelle 2.1) getestet. Der entsprechende *Immunoblot* ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

ERGEBNISSE

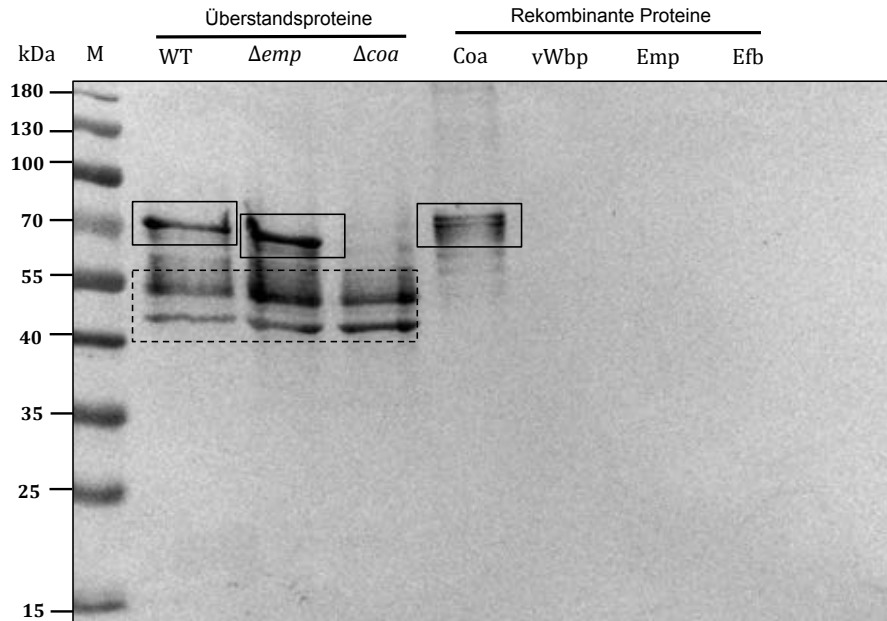


Abbildung 3.26: mAk C231D3 (α -Coa-Immunoblot)

Test von mAk C231D3 im Immunoblot: Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundärantikörper α -Maus IgG/IgM AP. M: Markerproteine in kDa. TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine diverser *S. aureus*-Stämme aus je ca. 5,4 ml Flüssigkulturüberstand: WT: *S. aureus* Newman, Δemp : *S. aureus* Newman *vwbp emp*, Δcoa : *S. aureus* Newman *coa*. Rekombinante Proteine (je 0,5 μ g): Coa: rekombinante Coa, vWbp: rekombinantes vWbp, Emp: rekombinantes Emp, Efb: rekombinantes Efb. Durchgehender Rahmen: Coa. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

Zur Bestimmung der Detektionsgrenze von mAk A231D3 im Immunoblot wurde eine Verdünnungsreihe der entsprechenden rekombinanten Coa (0,0025 – 2,5 μ g) angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

ERGEBNISSE

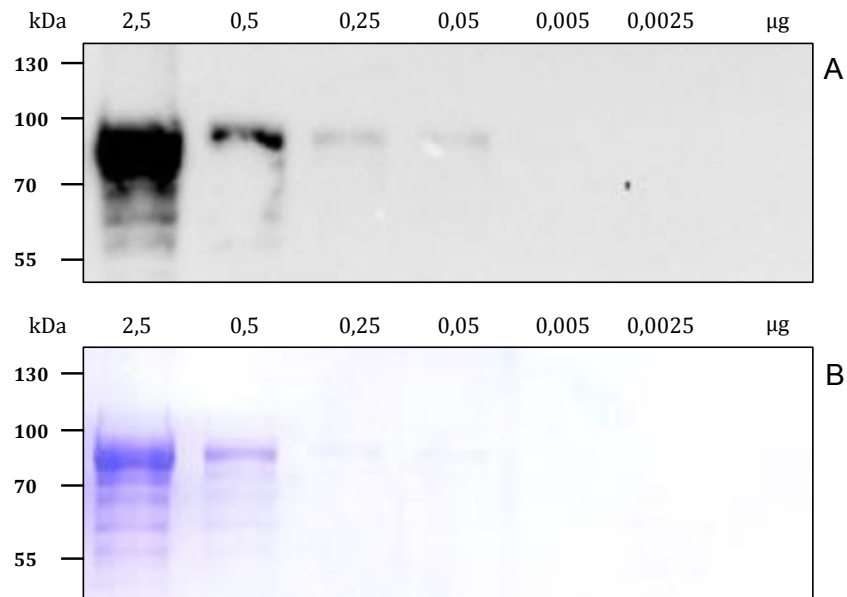


Abbildung 3.27: Detektionsgrenze von mAk C231D3 (α-CoA-Immunoblot) (A) und SDS-PAGE (B)

Zur Evaluierung der Detektionsgrenze von mAk C231D3 wurde ein Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe der rekombinanten Coa angefertigt (A). Dazu wurden die Proben in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundär-Ak α-Maus IgG HRP. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München) (vgl. 2.16.3.4). Die Belichtungszeit betrug 165 sec. In B ist die entsprechende Coomassiegefärbte SDS-PAGE dargestellt. Mit mAk C231D3 lassen sich noch 0,05 µg der rekombinanten Coa detektieren.

Nach dem Ergebnis der Isotypisierung des mAk C231D3 (α-Coa) ist dieser der Klasse IgG_{2b} zuzuordnen (vgl. Abbildung 3.28).

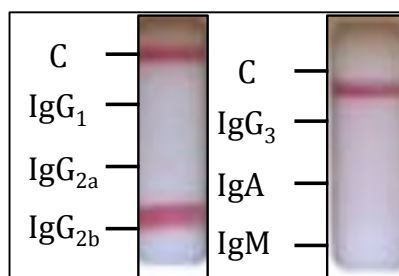


Abbildung 3.28: Isotypisierung von mAk C231D3 (α-Coa)

Die Durchführung des Tests ist in Abschnitt 2.20.5 beschrieben. C: Kontrolle. Der mAk C231D3 ist der Klasse IgG_{2b} zuzuordnen.

3.2.4.2 mAk C202H7 (α -Efb)

Klon C202H7 produzierte stabil monoklonale Antikörper gegen rekombinantes Efb. Um auszuschließen, dass es sich bei dem erkannten Epitop um den (His)₆-Tag des rekombinanten Efb handelte, wurde getestet, ob der mAk auch mit weiteren in dieser Arbeit in gleicher Weise hergestellten rekombinanten Proteinen (Coa, vWbp, Emp, vgl. 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.3) reagierte. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der *Immunoblot* wurde mit unverdünntem Überstand von mAk C202H7 inkubiert. Eine Reaktion war nur mit dem rekombinant hergestellten Efb nachweisbar. Das zugehörige Epitop musste also auf dem rekombinanten Efb selbst liegen. Im selben *Immunoblot* wurde getestet, ob mAk C202H7 neben dem rekombinanten Efb auch das von *S. aureus* Newman (vgl. vgl. Tabelle 2.1) sezernierte Efb erkannte. Dazu wurden TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine verwendet. Getestet wurden zusätzlich die Proteine der Mutanten *S. aureus* Newman *coa* und *S. aureus* Newman *vwbp emp* (vgl. Tabelle 2.1). Bei allen drei Proben konnte eine Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von ca. 15 kDa nachgewiesen werden. Die rekombinante Efb-Proteinbande lag bei ca. 19 kDa (vgl. Abbildung 3.29). Eine Erklärung für diesen Größenunterschied könnte auf eine partielle Degradation des Proteins zurückzuführen sein.

mAk C202H7 wurde bereits in der Dissertation von Böllner (2015) zur Charakterisierung des Exoproteinprofils von MRSA-Referenzstämmen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass mit mAk C202H7 auch von *S. aureus* Newman sezerniertes Efb im *Immunoblot* detektiert werden kann (Böllner, 2015).

ERGEBNISSE

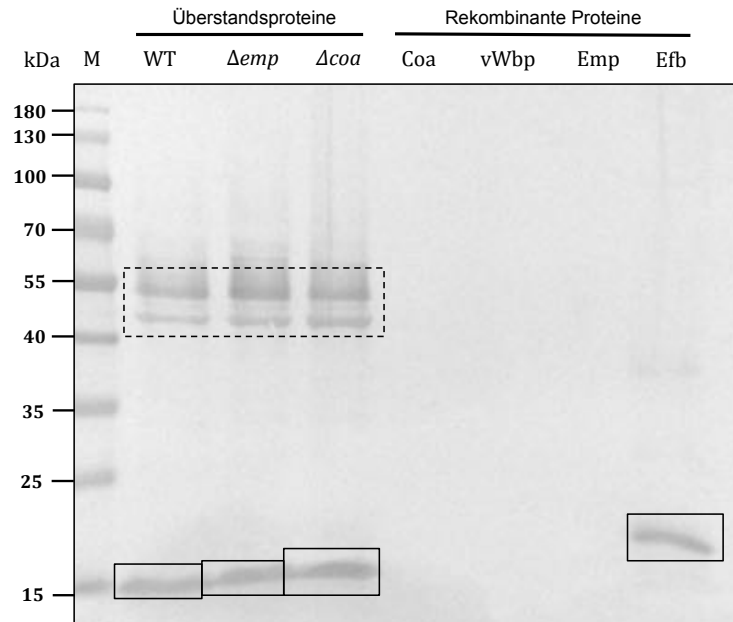


Abbildung 3.29: mAk C202H7 (α -Efb-Immunoblot)

Test von mAk C202H7 im Immunoblot: Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundärantikörper α -Maus IgG/IgM AP. M: Markerproteine in kDa. TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine diverser *S. aureus*-Stämme aus je ca. 5,4 ml Flüssigkulturüberstand: WT: *S. aureus* Newman, Δemp : *S. aureus* Newman *vwbp emp*, Δcoa : *S. aureus* Newman *coa*. Rekombinante Proteine (je ca. 0,5 μ g): Coa: rekombinante Coa, vWbp: rekombinantes vWbp, Emp: rekombinantes Emp, Efb: rekombinantes Efb. Durchgehender Rahmen: Efb. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

Um die Ergebnisse weiterer Versuche mit mAk C202H7 beurteilen zu können, war es wichtig zu wissen, welche Menge an Protein im *Immunoblot* damit gerade noch nachgewiesen werden kann (Detektionsgrenze). Dazu wurde ein *Immunoblot* mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Efb (0,0025 – 2,5 μ g, vgl. Abbildung 3.30) hergestellt. Die in der Probe vorhandene Menge war zuvor mit der Methode nach Bradford quantifiziert worden (vgl. 2.16.6).

ERGEBNISSE

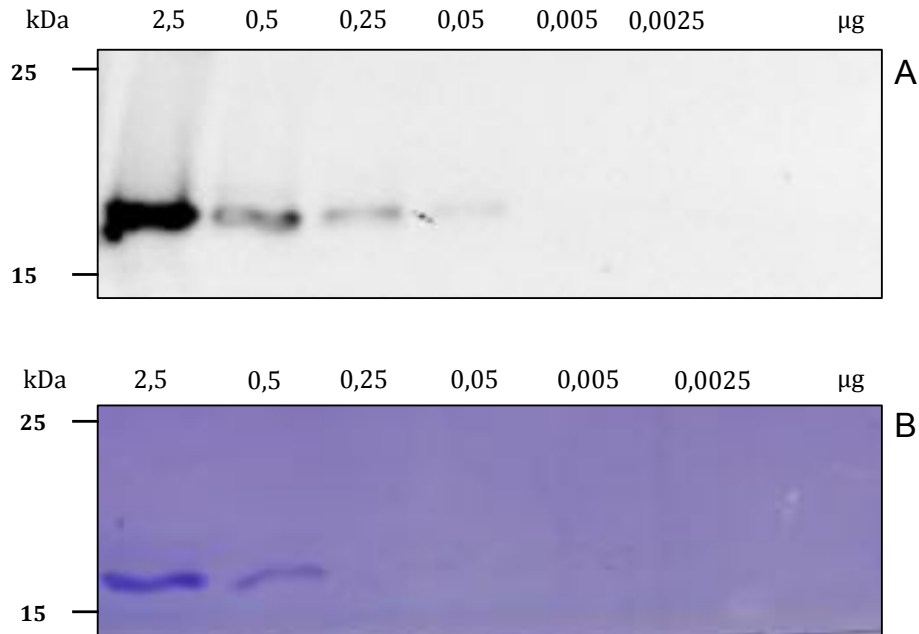


Abbildung 3.30: Detektionsgrenze von mAk C202H7 (α-Efb-Immunoblot) (A) und SDS-PAGE (B)

Zur Evaluierung der Detektionsgrenze von mAk C202H7 wurde ein Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Efb angefertigt (A). Dazu wurden die Proben in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundär-Ak α-Maus IgG HRP. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München), vgl. 2.16.3.4. Die Detektionszeit betrug 165 sec. In B ist die entsprechende Coomassie-gefärbte SDS-PAGE dargestellt. Mit mAk C202H7 lassen sich noch 0,05 µg des rekombinanten Efb detektieren.

Die Isotypisierung von mAk C202H7 wurde wie in Abschnitt 2.20.5. beschrieben durchgeführt. Der monoklonale Antikörper ist demnach der Klasse IgG_{2b} zuzuordnen (vgl. Abbildung 3.31).

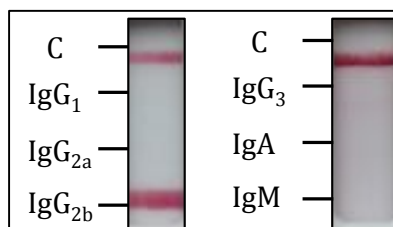


Abbildung 3.31: Isotypisierung von mAk C202H7 (α-Efb)

Die Durchführung des Tests ist in 2.20.5 beschrieben. C: Kontrolle. Der mAk C202H7 ist der Klasse IgG_{2b} zuzuordnen.

3.2.5 2. Immunisierung mit rekombinantem vWbp

Da aus den vorangegangenen Immunisierungen keine monoklonalen Antikörper gegen vWbp generiert werden konnten, wurde erneut eine Immunisierung mit rekombinantem vWbp (vgl. 3.2.3) durchgeführt. Auch bei dieser Immunisierung konnten initial nur sehr wenige positive Klone identifiziert werden. Davon gelang jedoch die Selektion eines stabilen Klons (mAk D35B11).

3.2.5.1 mAk D35B11 (α -vWbp)

Klon D35 erwies sich in der Produktion von α -vWbp als stabil. Analog zum Vorgehen bei den zuvor produzierten mAks (vgl. 3.2.4.1 und 3.2.4.2), war auch hier zunächst der Nachweis der Spezifität für vWbp notwendig. Dazu wurden die neben vWbp in dieser Arbeit produzierten rekombinanten Proteine (Coa, Emp, Efb) in einem *Immunoblot* mit mAk D35B11 verwendet. Der monoklonale Antikörper reagierte nur mit dem rekombinanten vWbp. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das vom Antikörper erkannte Epitop der (His)₆-Tag oder die Faktor Xa-Schnittstelle war. Im selben *Immunoblot* wurde getestet, ob mAk D35B11 neben dem rekombinanten vWbp auch das entsprechende Epitop auf dem von *S. aureus* Newman sezernierten vWbp erkannte. Dazu wurden die TCA-gefällten Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* Newman und der Mutanten *S. aureus* Newman *coa* und *S. aureus* Newman *vwbp emp* in einem *Immunoblot* mit unverdünntem Zellkulturüberstand von Klon D35B11 inkubiert (vgl. Abbildung 3.32 und Tabelle 2.1).

mAk D35B11 wurde bereits in der Dissertation von Böllner mit meiner Mitwirkung zur Charakterisierung von MRSA-Referenzstämmen verwendet (Böllner, 2015).

ERGEBNISSE

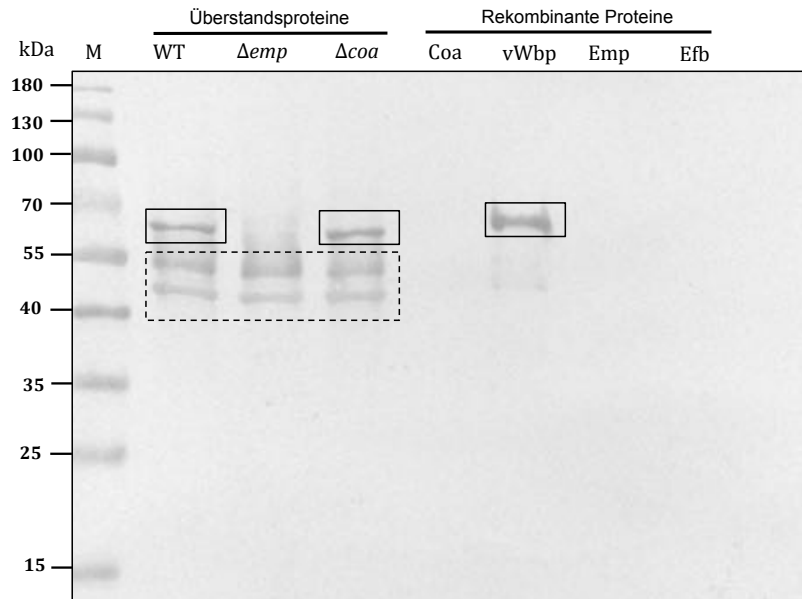


Abbildung 3.32: mAk D35B11 (α -vWbp-Immunoblot)

Test von mAk D35B11 im Immunoblot: Die Proben wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundärantikörper α -Maus IgG/IgM AP. M: Markerproteine in kDa. TCA-gefällte Kulturüberstandsproteine diverser *S. aureus*-Stämme aus je ca. 5,4 ml Flüssigkulturüberstand: WT: *S. aureus* Newman, Δemp : *S. aureus* Newman *vwbp emp*, Δcoa : *S. aureus* Newman *coa*. Rekombinante Proteine (je 0,5 μ g): Coa: rekombinante Coa, vWbp: rekombinantes vWbp, Emp: rekombinantes Emp, Efb: rekombinantes Efb. Durchgehender Rahmen: vWbp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

Die Bestimmung der Detektionsgrenze von mAk D35B11 (α -vWbp) im Immunoblot erfolgte mittels einer Verdünnungsreihe des rekombinanten vWbp (vgl. Abbildung 3.33).

ERGEBNISSE

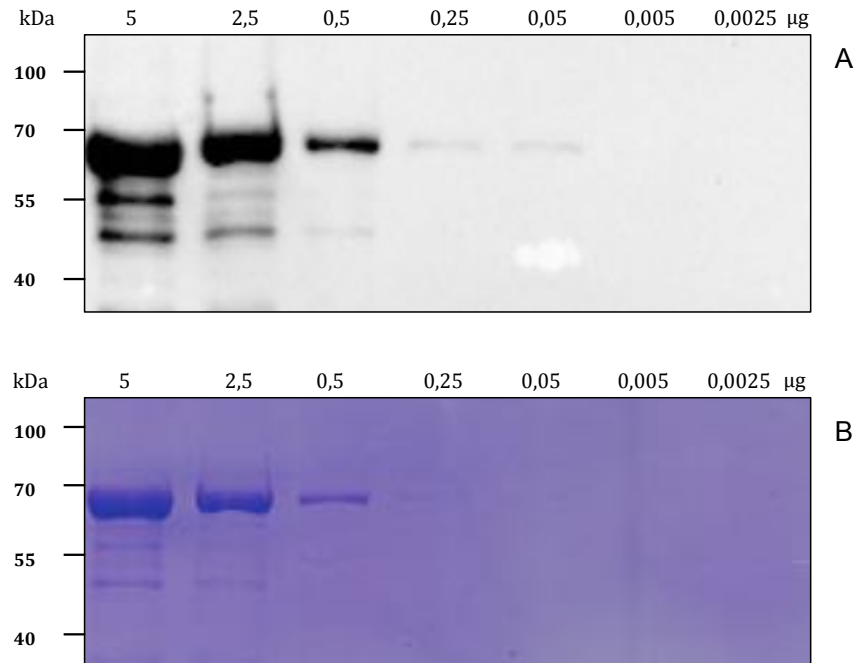


Abbildung 3.33: Detektionsgrenze von mAk D35B11 (α -vWbp-Immunoblot) (A) und SDS-PAGE (B)

Zur Evaluierung der Detektionsgrenze von mAk D35B11 wurde ein Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten vWbp angefertigt (A). Dazu wurden die Proben in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand verwendet, als Sekundär-Ak α -Maus IgG HRP. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München), (vgl. 2.16.3.4). Die Detektionszeit betrug 165 sec. In B ist die entsprechende Coomassie-gefärbte SDS-PAGE dargestellt. Mit mAk D35B11 lassen sich noch 0,05 µg des rekombinanten vWbp detektieren.

Nach dem Ergebnis der Isotypisierung ist mAk D35B11 der Klasse IgG_{2b} zuzuordnen (vgl. Abbildung 3.34).

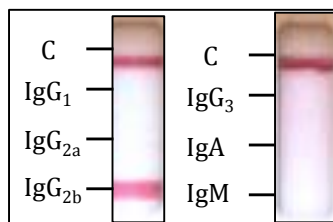


Abbildung 3.34: Isotypisierung von mAk D35B11 (α -vWbp)

Das Ergebnis der Isotypisierung kann bei positiven Kontrollbanden (C) direkt abgelesen werden. Demnach handelt es sich bei mAk D35B11 eindeutig um einen Antikörper der Klasse IgG_{2b}. Zur Durchführung des Tests vgl. Abschnitt 2.20.5.

3.3 Nachweis der SERAMs Coa, vWbp, Emp und Efb mittels monoklonaler Antikörper bei klinischen MSSA- und MRSA-Isolaten

Einige der in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper (A214C9, C202H7, D135B11) wurden bereits in der Dissertation von Böllner zur Charakterisierung des Proteinsekretionsmusters von MRSA-Referenzstämmen (vgl. Tabelle 2.2) mittels *Immunoblot* verwendet (Böllner, 2015). Dabei wurden die Profile der sezernierten Proteine (Exoproteine) der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase verglichen. Zur Anreicherung verwendete Böllner „StrataClean Resin“ (Stratagene, Waldbronn). Da in den damit angefertigten *Immunoblots* die Antigene der MRSA-Referenzstämmen teilweise nur in sehr geringen Mengen (Efb, Emp) oder überhaupt nicht (Coa, vWbp) nachweisbar waren, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich hinter den negativen Ergebnissen ein methodisches Problem verbergen könnte. Die *Immunoblots* wurden unter modifizierten Bedingungen erneut durchgeführt. Die Kulturüberstandsproteine aus den Flüssigkulturen wurden mittels TCA-Fällung angereichert (vgl. 2.16.4). Im Gegensatz zu Böllner (Dissertation, 2015) wurde zur Kultivierung statt LB-Medium das Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet. Für die exponentielle Phase wurden die Stämme 3 h 45 min kultiviert. Unterschiede in der OD₆₀₀ wurden durch Anpassung des Resuspensionsvolumens des Proteinsediments ausgeglichen. In der Dissertation von Böllner (2015) wurde zur Untersuchung der exponentiellen Wachstumsphase eine OD₆₀₀ = 0,45 gewählt (Böllner, 2015). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich die untersuchten Exoproteine im Zellsediment der entsprechenden Flüssigkulturen nachweisen lassen (Bakterien-assoziierte Exoproteine). Dazu wurde auf ein von Hussain *et al.* (2010) publiziertes Protokoll zur Extraktion zellwandassoziiierter Proteine zurückgegriffen und unter modifizierten Bedingungen angewendet (vgl. 2.16.5). Neben den MRSA-Referenzstämmen (vgl. Tabelle 2.2) wurden darüber hinaus weitere klinische MRSA und MSSA-Isolate (Blutkultur-, Sputum- und Wundisolate) unter gleichen Bedingungen getestet (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4). Als Kontrollstämmen wurden jeweils *S. aureus* Newman sowie die entsprechenden Deletionsmutanten (*S. aureus* Newman *coa* und *S. aureus* Newman *vwbp emp*, vgl. Tabelle 2.1) und die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine (Coa, vWbp, Emp, Efb) verwendet. Die jeweiligen Proben wurden zur Kontrolle in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (SDS-Gele nicht gezeigt).

3.3.1 *Immunoblots* zum Nachweis von Coa mit mAk C231D3 (α -Coa)

Abbildung 3.35 bis Abbildung 3.38 zeigen die α -Coa-*Immunoblots*. Zur Detektion wurde mAk C231D3 (α -Coa, vgl. 3.2.4.1) verwendet. Getestet wurden sowohl klinische MSSA- und MRSA-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) als auch die bereits von Böllner (2015) untersuchten MRSA-Referenzstämme (vgl. Tabelle 2.2). Dazu wurden Proben TCA-gefällter Kulturüberstandsproteine aus RPMI-Flüssigkulturen mit den Zellwandextrakten der entsprechenden Zellsedimente jeweils in der exponentiellen und stationären Phase verglichen. Eine Übersicht zu den Ergebnissen der Coa-*Immunoblots* findet sich in Tabelle 3.2.

ERGEBNISSE

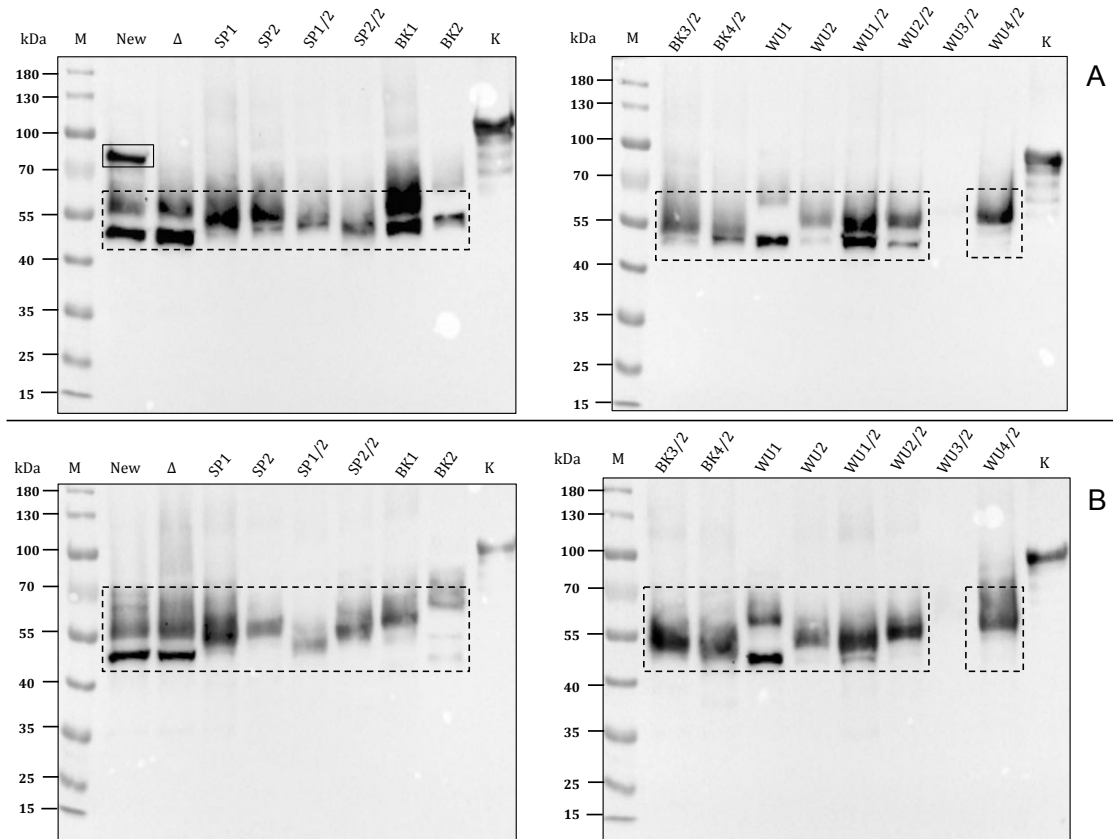


Abbildung 3.35: Immunoblots zum Nachweis von Coa im RPMI-Kulturüberstand klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).

Die RPMI-Flüssigkulturen der exponentiellen Phase (A) wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ kultiviert. Kleine Unterschiede wurden durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Medium ausgeglichen. Die Flüssigkulturen der stationären Phase (B) wurden nach 16 h geerntet. Unterschiede in der OD_{600} wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 70 (empirisch ermittelt) ausgeglichen (Resuspensionsvolumen des Proteinpellets in μl = $OD_{600} \times 70$). Je 10 μl der exponentiellen Phase (A, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 μl der stationären Phase (B, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einer 10 % SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Immunoblots wurden mit unverdünntem Zellkulturüberstand des Klons C231D3 (α -Coa) inkubiert. Als Sekundär-Ak wurde α -Maus IgG HRP verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München) (vgl. 2.16.3.4). K: Positivkontrolle (0,5 μg rekombinante Coa), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman coa. Durchgehender Rahmen: Coa. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

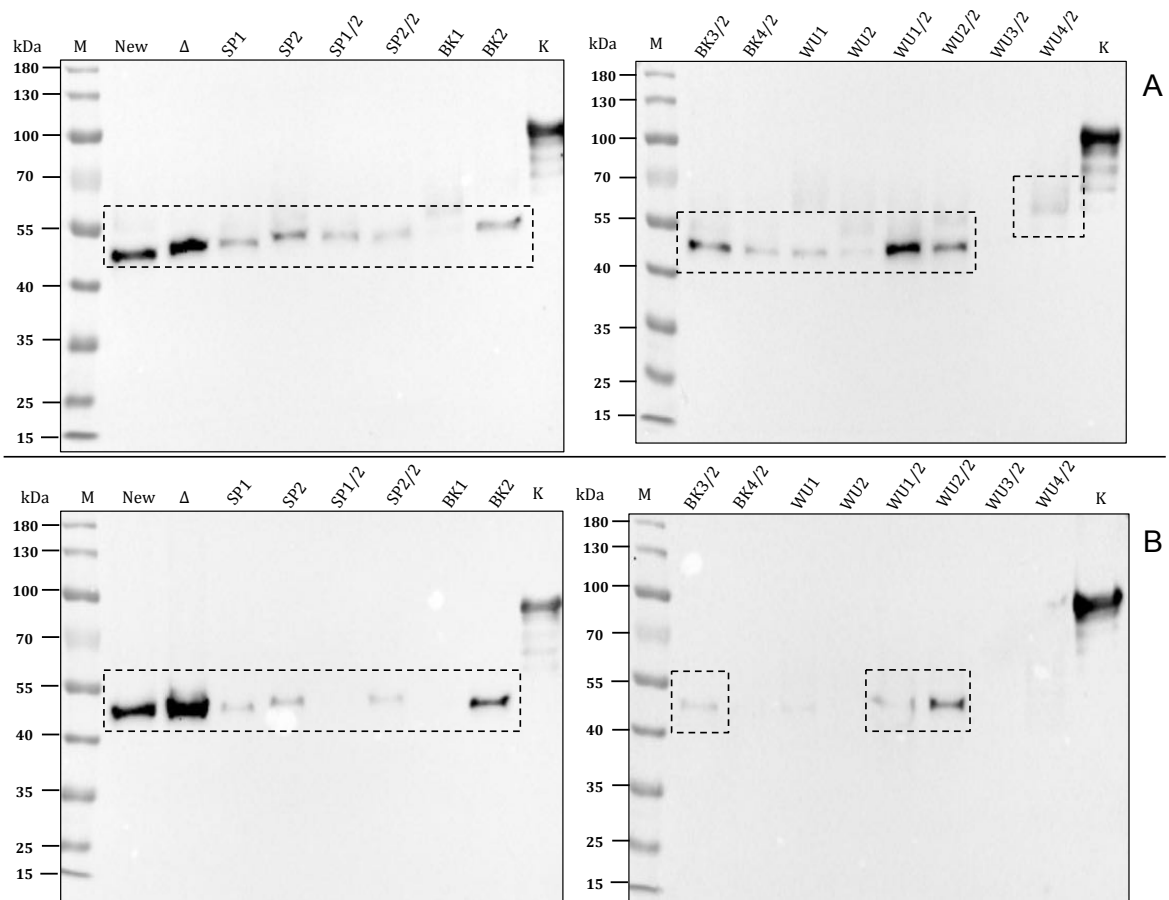


Abbildung 3.36: Immunoblots zum Nachweis von Coa im Zellsediment klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).

Die Zellsedimente der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.35 wurden in der gleichen Weise auf Vorhandensein von Coa untersucht. Dazu wurden die zellwandassoziierten Proteine wie in Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus dem Zellsediment extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden je 10 μ l der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur), bzw. 5 μ l der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Immunoblots erfolgte wie in Abbildung 3.35 beschrieben. K: Positivkontrolle (0,5 μ g rekombinante Coa), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman *coa*. Gestrichelte Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

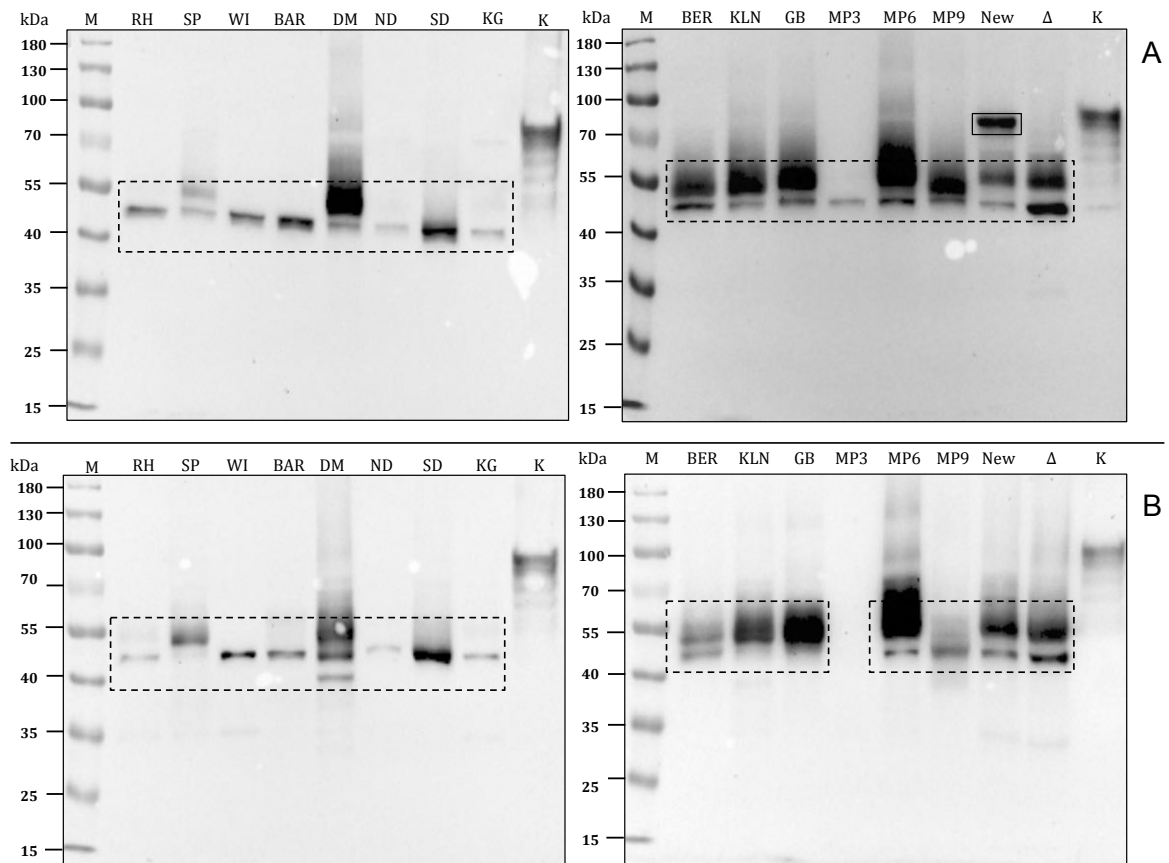


Abbildung 3.37: Immunoblots zum Nachweis von Coa im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in exponentiellen (A) und stationären Phase (B).

Zur Anfertigung der Immunoblots und Stammbezeichnung siehe Abbildung 3.35. Im Unterschied dazu wurden die Kulturen der exponentiellen Phase nach 3 h 45 geerntet und das Resuspensionsvolumen des Proteinsediments nach folgender Formel berechnet (Volumen in μl = $250 \times \text{OD}_{600}$). K: Positivkontrolle ($0,5 \mu\text{g}$ rekombinante Coa), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: Coa. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

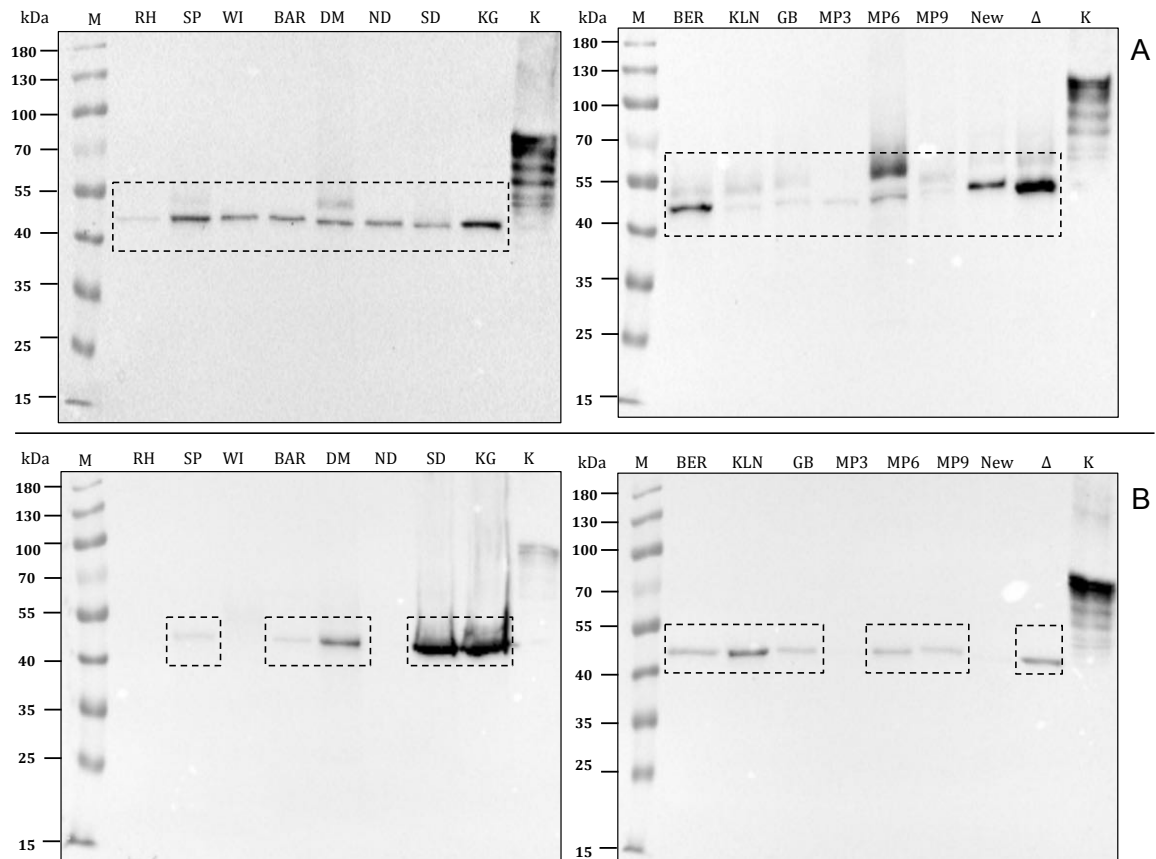


Abbildung 3.38: Immunoblots zum Nachweis von Coa im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären Phase (B).

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.37 extrahiert. In der SDS-PAGE wurden je 10 µl der exponentielle Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 µl der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Immunoblots erfolgte wie in Abbildung 3.35 beschrieben. K: Positivkontrolle (0,5 µg rekombinante Coa), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman *coa*. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

Ein spezifischer Nachweis für Coa war nur im RPMI-Kulturüberstand von *S. aureus* Newman in der exponentiellen Phase möglich (vgl. Abbildung 3.35 und Abbildung 3.37). Für alle anderen Stämme (siehe Kurzbezeichnungen Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4) zeigten sich in den RPMI-Kulturüberständen sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase nur die beschriebenen unspezifischen Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1, sowie Abbildung 3.35 und Abbildung 3.37).

Auch in den Zellsedimenten der entsprechenden *S. aureus*-Stämme (mit *S. aureus* Newman) war Coa in keiner der untersuchten Wachstumsphasen nachweisbar (vgl. Abbildung 3.36 und Abbildung 3.38).

3.3.2 Immunoblots zum Nachweis von vWbp mit mAk D35B11 (α -vWbp)

Folgende Abbildungen (Abbildung 3.39 bis Abbildung 3.42) zeigen die vWbp-*Immunoblots* für diverse *S. aureus*-Stämme (vgl. Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4). Zur Detektion wurde mAk D35B11 (α -vWbp, vgl. 3.2.5.1) verwendet. Getestet wurden sowohl klinische MSSA- und MRSA-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) als auch die bereits in der Dissertation von Böllner untersuchten MRSA-Referenzstämme (vgl. Tabelle 2.2) (Böllner, 2015). Dazu wurden Proben TCA-gefällter Kulturüberstandsproteine aus RPMI-Flüssigkulturen mit den Zellwandextrakten der entsprechenden Zellsedimente jeweils in der exponentiellen und stationären Phase verglichen. Eine Übersicht zu den Ergebnissen der vWbp-*Immunoblots* findet sich in Tabelle 3.3.

ERGEBNISSE

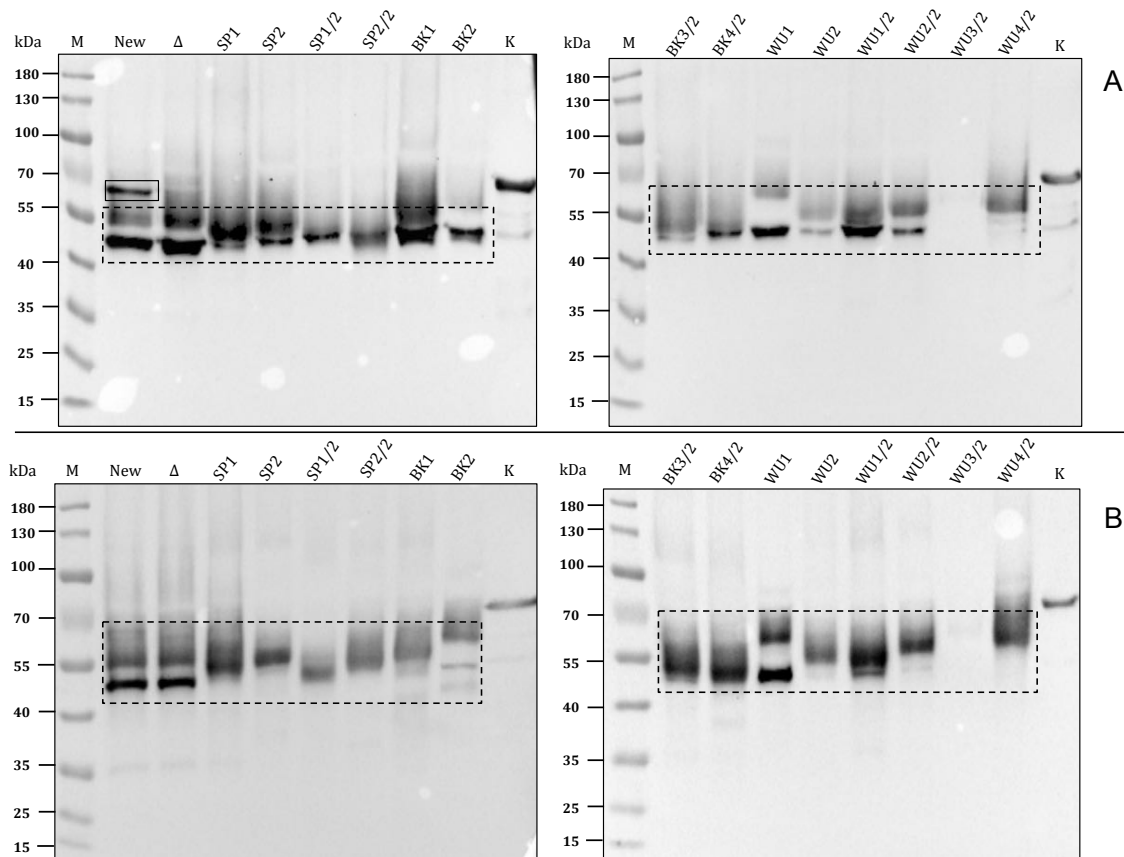


Abbildung 3.39: Immunoblots zum Nachweis von vWbp im RPMI-Kulturüberstand klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die RPMI-Flüssigkulturen der exponentiellen Phase (A) wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ kultiviert. Kleine Unterschiede wurden durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Medium ausgeglichen. Die Flüssigkulturen der stationären Phase (B) wurden nach 16 h geerntet. Unterschiede in der OD_{600} wurden dabei durch Multiplikation mit dem Faktor 70 (empirisch ermittelt) ausgeglichen (Resuspensionsvolumen des Proteinsediments in $\mu\text{l} = OD_{600} \times 70$). Je 10 μl der exponentiellen Phase (A, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkulturüberstand) bzw. 5 μl der stationären Phase (B, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkulturüberstand) wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einer 10 % SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Immunoblots wurden mit unverdünntem Zellkulturüberstand des Klon D35B11 (α -vWbp) inkubiert. Als Sekundär-Ak wurde α -Maus IgG HRP verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München), (vgl. 2.16.3.4). K: Positivkontrolle (0,5 μg rekombinantes vWbp), New: *S. aureus* Newman, Δ : *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4). Durchgehender Rahmen: vWbp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

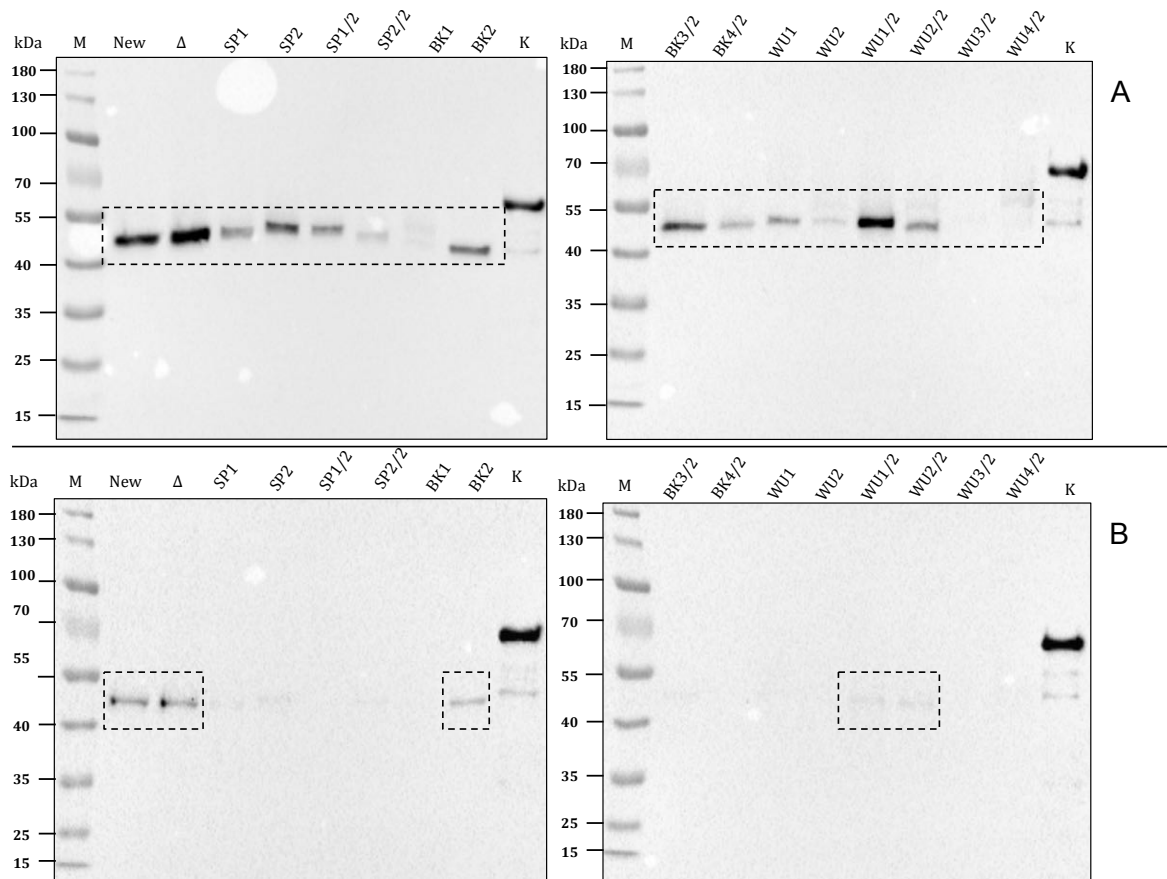


Abbildung 3.40: : Immunoblots zum Nachweis von vWbp im Zellsediment klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.39 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 µl der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Immunoblots erfolgte wie in Abbildung 3.39 beschrieben. K: Positivkontrolle (0,5 µg rekombinantes vWbp), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: vWbp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

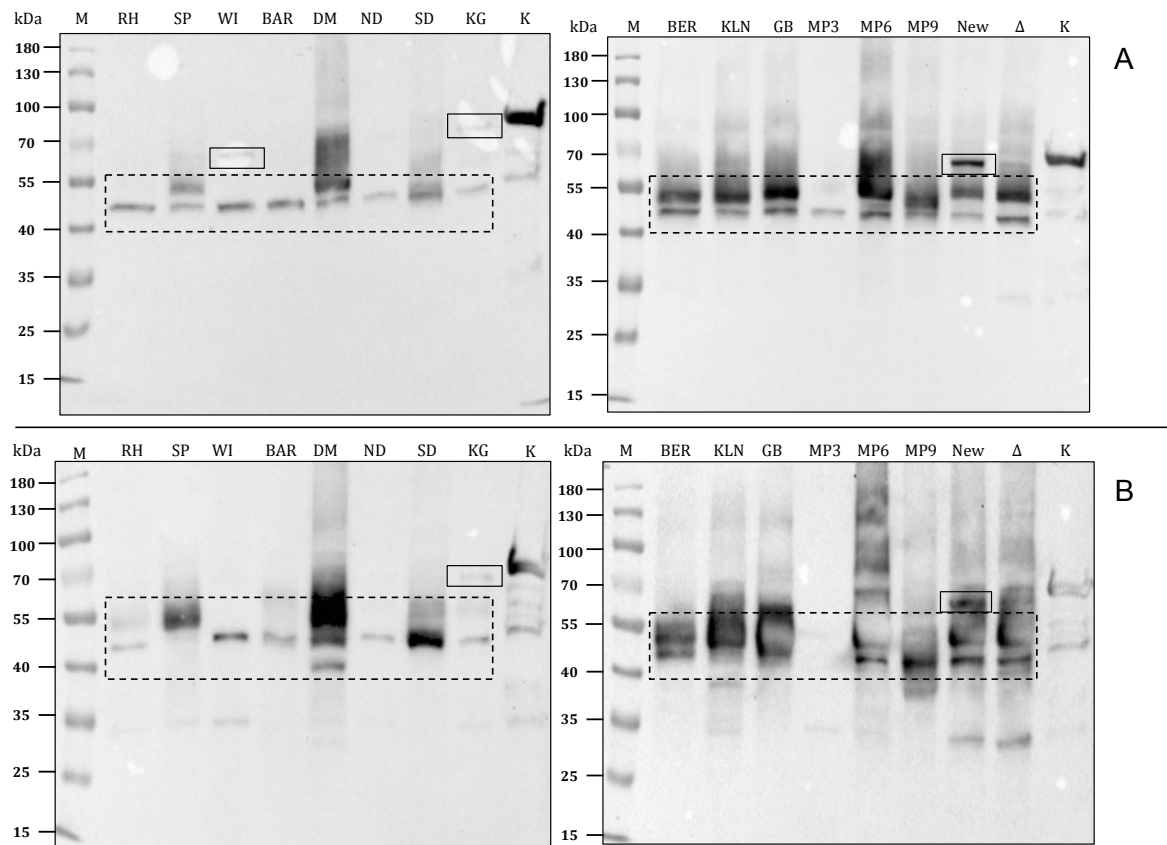


Abbildung 3.41: Immunoblots zum Nachweis von vWbp im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Zur Anfertigung und Entwicklung der Immunoblots vgl. Abbildung 3.39. Im Unterschied dazu wurden die Kulturen der exponentiellen Phase nach 3 h 45 geerntet und das Resuspensionsvolumen des Proteinpellets nach folgender Formel berechnet (Volumen in μl = $250 \times \text{OD}_{600}$). K: Positivkontrolle ($0,5 \mu\text{g}$ rekombinantes vWbp), New: *S. aureus* Newman, Δ : *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: vWbp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

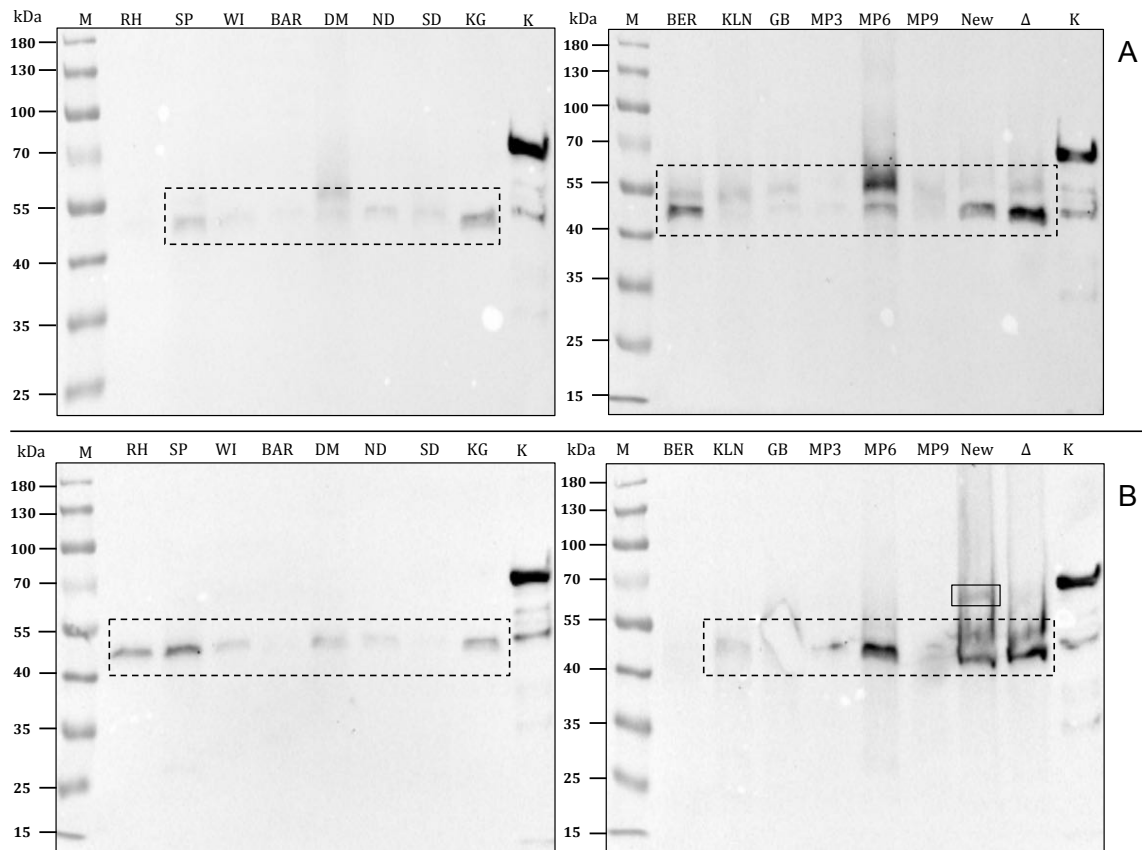


Abbildung 3.42: Immunoblots zum Nachweis von vWbp im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.39 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 µl der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Blots erfolgte wie in Abbildung 3.39 beschrieben. K: Positivkontrolle (0,5 µg rekombinantes vWbp), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: vWbp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

In den RPMI-Kulturüberständen war vWbp bei *S. aureus* Newman und dem MRSA-Referenzstamm KG in der exponentiellen sowie in der stationären Phase nachweisbar (Abbildung 3.41). Der MRSA-Referenzstamm WI zeigte in der exponentiellen Phase eine schwache vWbp-Proteinbande (Abbildung 3.41). Bei allen anderen untersuchten MSSA und MRSA-Stämmen waren in den RPMI-Kulturüberständen nur unspezifische Antikörperbindungsreaktionen nachweisbar (vgl. Abbildung 3.39, Abbildung 3.41 und 4.1.2.1). In den Zellsedimenten der untersuchten MSSA- und MRSA-Stämme (Abbildung 3.40 und Abbildung 3.42) war vWbp mit Ausnahme einer schwachen Bande bei *S. aureus* Newman in der stationären Wachstumsphase (Abbildung 3.42) in keinem Fall nachweisbar. Die beschriebenen unspezifischen Antikörperbindungsreaktionen zeigten sich auch in den Zellwandextrakten der untersuchten Stämme (Abbildung 3.40 und Abbildung 3.42 und 4.1.2.1).

3.3.3 Immunoblots zum Nachweis von Emp mit mAk A214C9 (α -Emp)

In Abbildung 3.43 bis Abbildung 3.46 sind die Emp-*Immunoblots* dargestellt. Zur Detektion wurde mAk A214C9 (α -Emp, vgl. 3.1.3.1) verwendet. Getestet wurden sowohl klinische MSSA- und MRSA-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) als auch die bereits in der Dissertation von Böllner untersuchten MRSA-Referenzstämme (vgl. Tabelle 2.2) (Böllner, 2015). Dazu wurden Proben TCA-gefällter Kulturüberstandsproteine aus RPMI-Flüssigkulturen mit den Zellwandextrakten der entsprechenden Zellsedimente jeweils in der exponentiellen und stationären Phase verglichen. Eine Übersicht zu den Ergebnissen der Emp-*Immunoblots* findet sich in Tabelle 3.4.

ERGEBNISSE

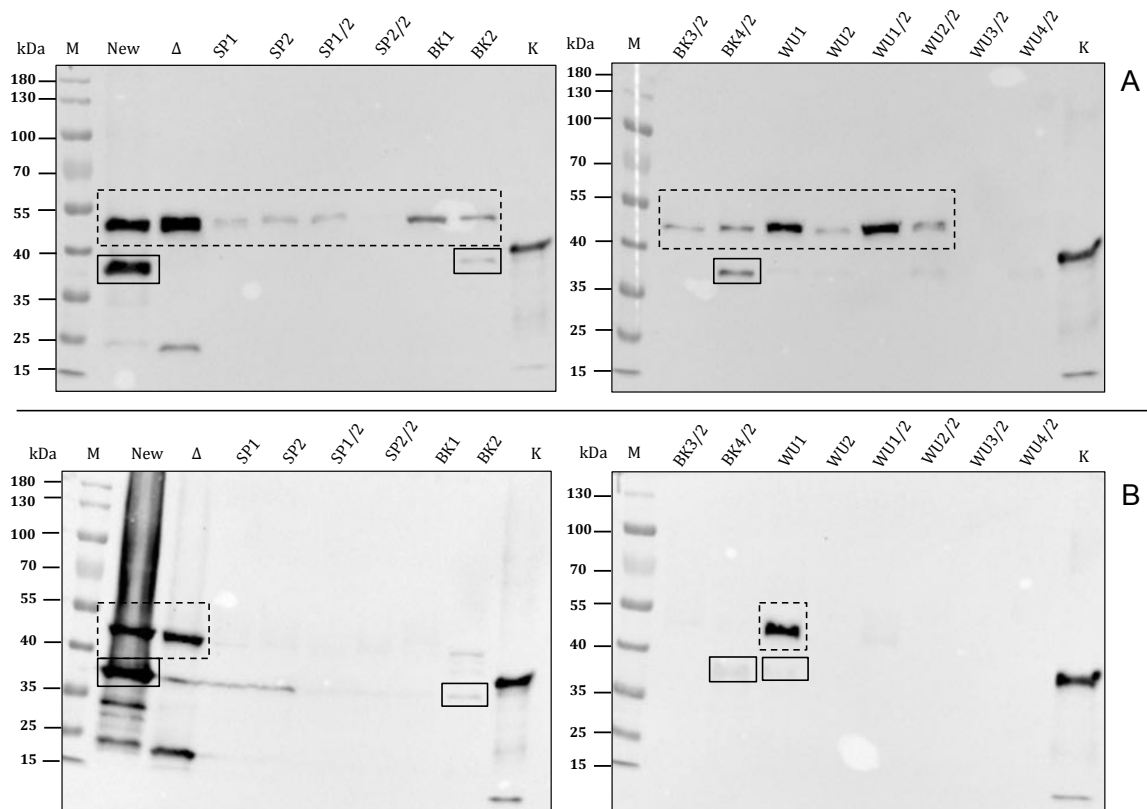


Abbildung 3.43: Immunoblots zum Nachweis von Emp im RPMI-Kulturüberstand klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die RPMI-Flüssigkulturen für die exponentielle Phase wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ kultiviert. Kleine Unterschiede wurden durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Medium ausgeglichen. Die Flüssigkulturen der stationären Phase wurden nach 16 h geerntet. Unterschiede in der OD_{600} wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 70 (empirisch ermittelt) ausgeglichen (Resuspensionsvolumen des Proteinsediments in μl = $OD_{600} \times 70$). Je 10 μl der exponentiellen Phase (A, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 μl stationären Phase (B, TCA-gefällte Überstandsproteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C solubilisiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einer 10 % SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Immunoblots wurden mit unverdünntem Zellkulturüberstand des Klons A214C9 (α -Emp) inkubiert. Als Sekundär-Ak wurde α -Maus IgG HRP verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem „ChemiDoc™ MP Imaging System“ von Bio-Rad (München) (vgl. 2.16.3.4). K: Positivkontrolle (0,5 μg rekombinantes Emp), New: *S. aureus* Newman, Δ : *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen vgl. Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: Emp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

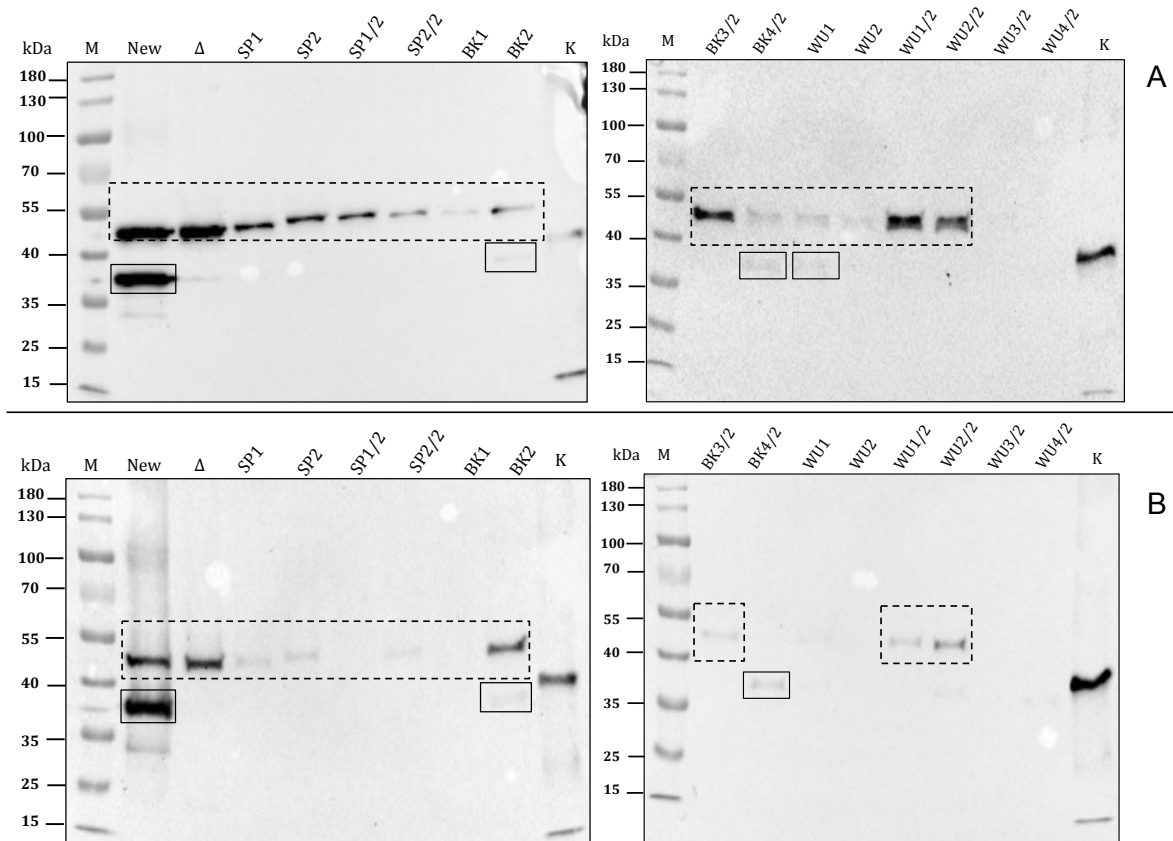


Abbildung 3.44: Immunoblots zum Nachweis von Emp im Zellsediment klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.43 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 µl der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Blots erfolgte wie in Abbildung 3.43 beschrieben. K: Positivkontrolle (0,5 µg rekombinantes Emp), New: *S. aureus* Newman, Δ: *S. aureus* Newman vwbp emp. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: Emp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

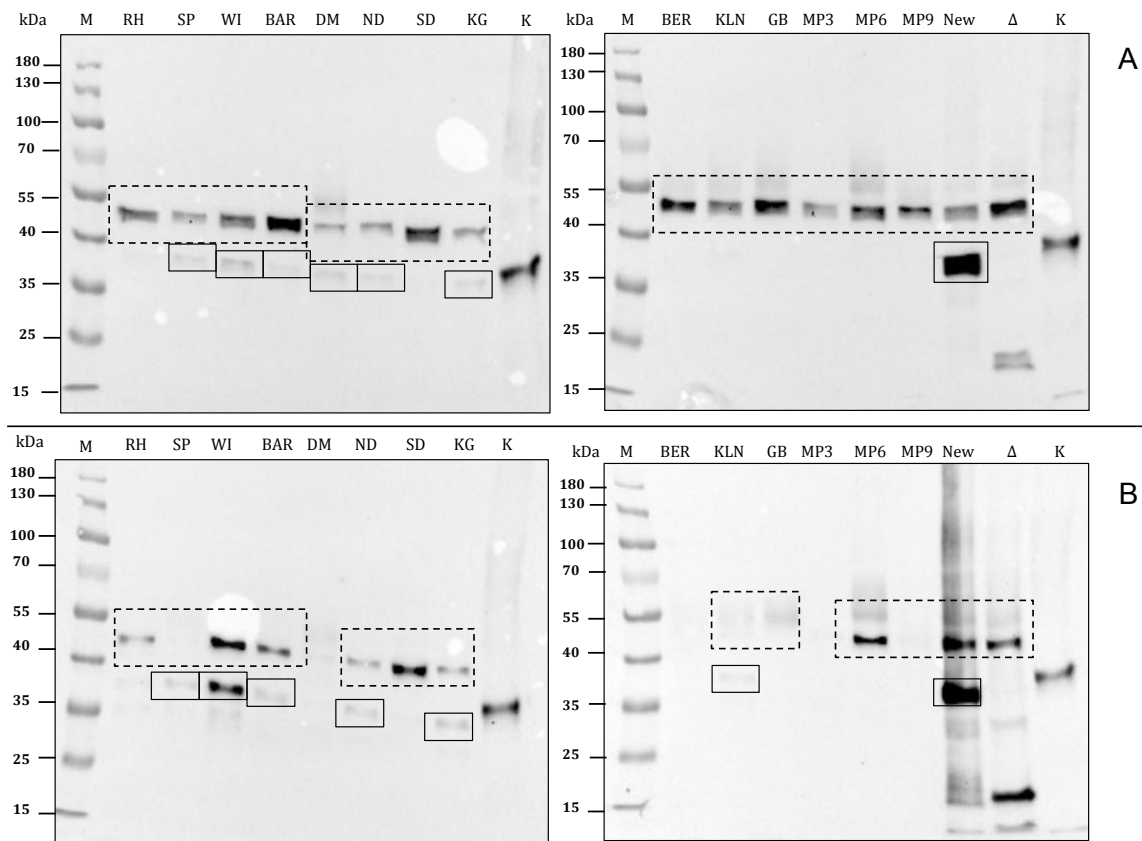


Abbildung 3.45: Immunoblots zum Nachweis von Emp im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Zur Anfertigung und Entwicklung der Immunoblots vgl. Abbildung 3.43. Im Unterschied dazu wurden die Kulturen der exponentiellen Phase nach 3 h 45 geerntet und das Resuspensionsvolumen des Proteinpellets nach folgender Formel berechnet (Volumen in μl = $250 \times \text{OD}_{600}$). K: Positivkontrolle (0,5 μg rekombinantes Emp), New: *S. aureus* Newman, Δ : *S. aureus* Newman vwbp emp. Durchgehender Rahmen: Emp. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1). Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4.

ERGEBNISSE

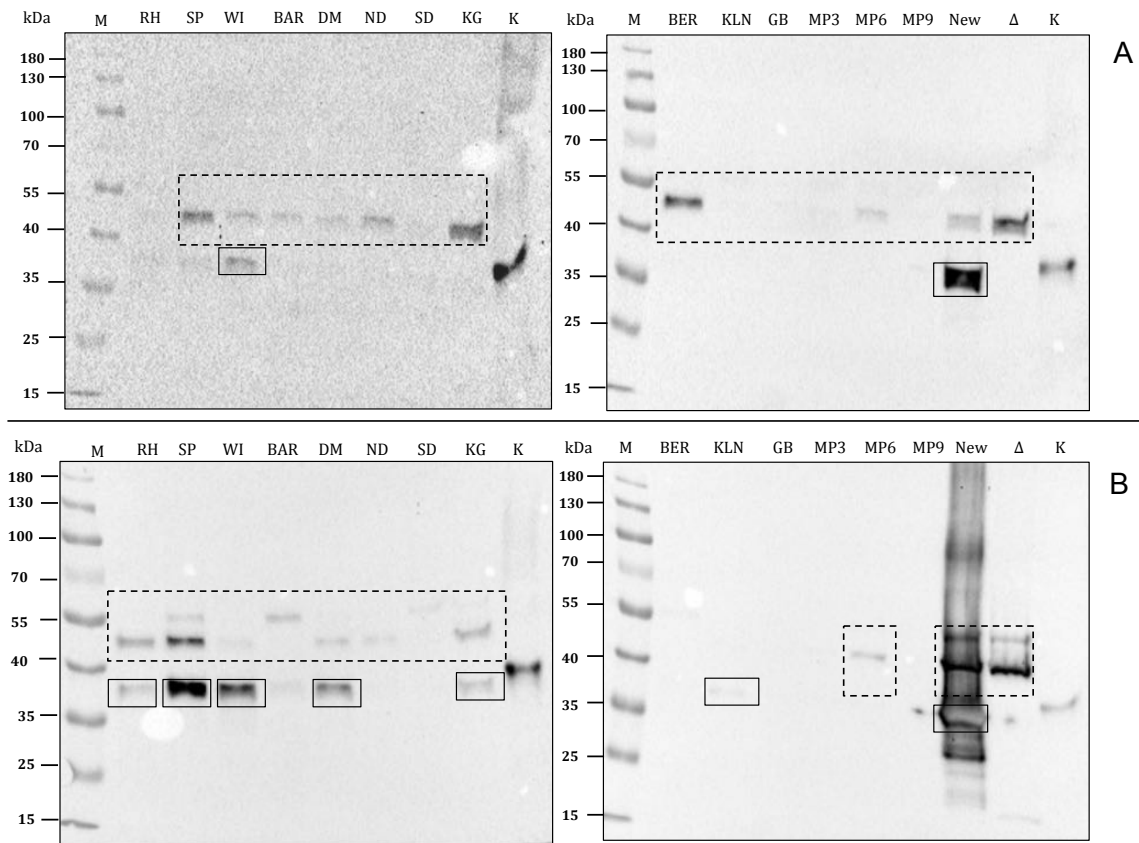


Abbildung 3.46: Immunoblots zum Nachweis von Emp im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase.

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.45 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden jeweils 10 μ l der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 μ l der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Blots erfolgte wie in Abbildung 3.39 beschrieben. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons A214C9 (α -Emp) verwendet. K: Positivkontrolle (rekombinantes Emp), New: *S. aureus* Newman, Δ : *S. aureus* Newman vwbp emp. Durchgehender Rahmen: Emp, gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1). Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4.

In den RPMI-Kulturüberständen war ein deutlicher Nachweis von Emp nur bei *S. aureus* Newman in der exponentiellen sowie in der stationären Phase möglich. In der exponentiellen Phase waren minimale Mengen Emp in den RPMI-Kulturüberständen der Stämme BK2 und BK4/2 nachweisbar und in der stationären Phase in den Kulturüberständen der Stämme BK2, BK4/2 und WU1. In den RPMI-Kulturüberständen folgender MRSA-Referenzstämme konnten schwächere Emp-Banden in der exponentiellen Phase nachgewiesen werden: SP, WI, BAR, DM, ND, KG. In der stationären Phase war Emp in den Kulturüberständen folgender MRSA-Referenzstämme Stämmen nachweisbar: SP, WI, BAR, ND, KG und KLN (vgl. Abbildung 3.43 und Abbildung 3.45; Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4). In den Zellsedimenten gelang ein deutlicher Nachweis von Emp für *S. aureus* Newman in der exponentiellen und stationären Phase. Schwächere Emp-Banden konnten für die Stämme BK2, BK4/2 und WU1 in der exponentiellen sowie für BK2 und BK4/2 in der stationären Phase der entsprechenden Zellsedimente nachgewiesen werden. In den Zellsedimenten der MRSA-Referenzstämme war für den Stamm WI eine schwache Emp-Bande in der exponentiellen Phase nachweisbar. In der stationären Phase war Emp bei den Stämmen RH, SP, WI, DM, KG und KLN nachweisbar (vgl. Abbildung 3.44 und Abbildung 3.46; für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4). Tabelle 3.4 bietet eine Übersicht zu den Ergebnissen der α -Emp-Immunoblots.

3.3.4 Immunoblots zum Nachweis von Efb mit mAk C202H7 (α -Efb)

Folgende Abbildungen (Abbildung 3.47 bis Abbildung 3.50) zeigen die Efb-Immunoblots. Zur Detektion wurde mAk C202H7 (α -Efb, vgl. 3.2.4.2) verwendet. Getestet wurden sowohl klinische MSSA- und MRSA-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) als auch die bereits in der Dissertation von Böllner untersuchten MRSA-Referenzstämme (vgl. Tabelle 2.2) (Böllner, 2015). Dazu wurden Proben TCA-gefällter Kulturüberstandsproteine aus RPMI-Flüssigkulturen mit den Zellwandextrakten der entsprechenden Zellsedimente jeweils in der exponentiellen und stationären Phase verglichen. Eine Übersicht zu den Ergebnissen der α -Efb-Immunoblots findet sich in Tabelle 3.5.

ERGEBNISSE

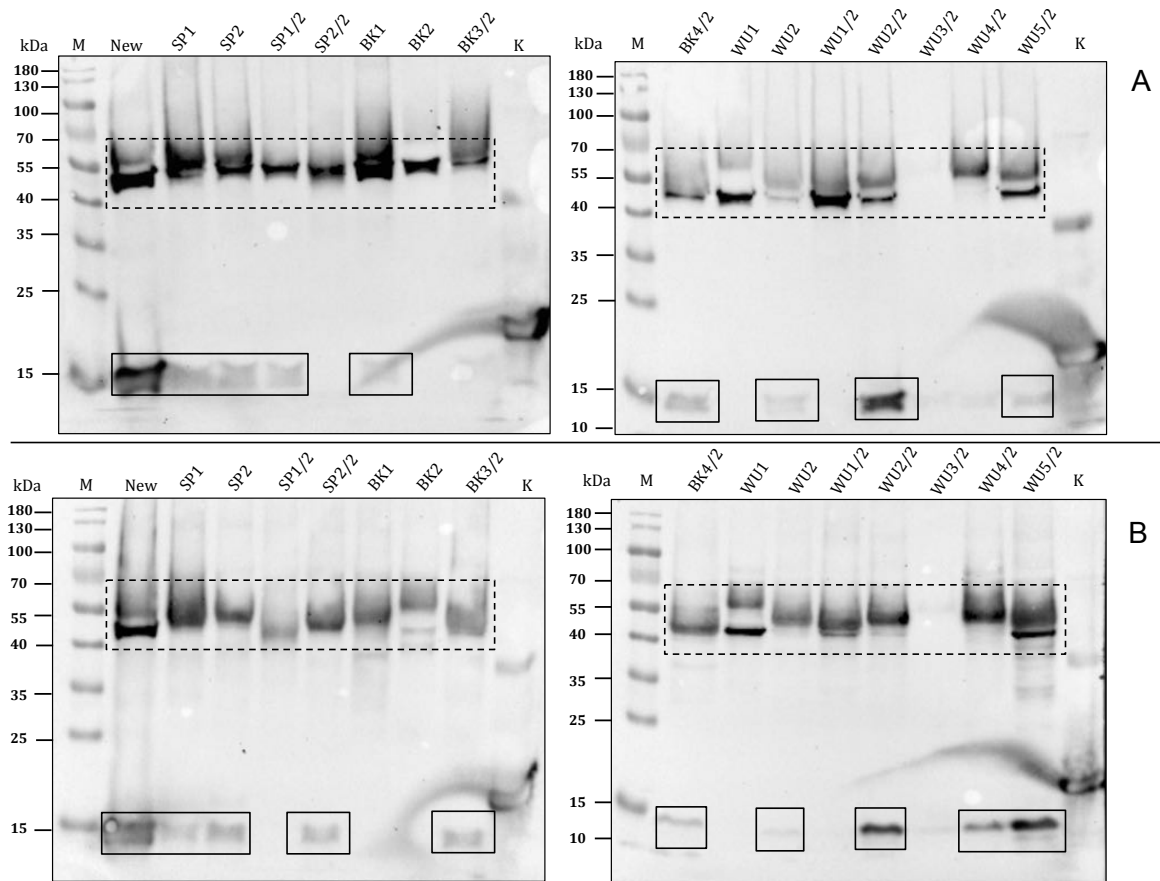


Abbildung 3.47: Immunoblots zum Nachweis von Efb im RPMI-Kulturüberstand klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) stationären (B) Phase.

Zur Anfertigung und Entwicklung der Immunoblots siehe Abbildung 3.43. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klon C202H7 (α -Efb) verwendet. K: Positivkontrolle (0,5 μ g rekombinantes Efb), New: *S. aureus* Newman. Durchgehender Rahmen: Efb. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1). Für Stammbezeichnungen vgl. Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4.

ERGEBNISSE

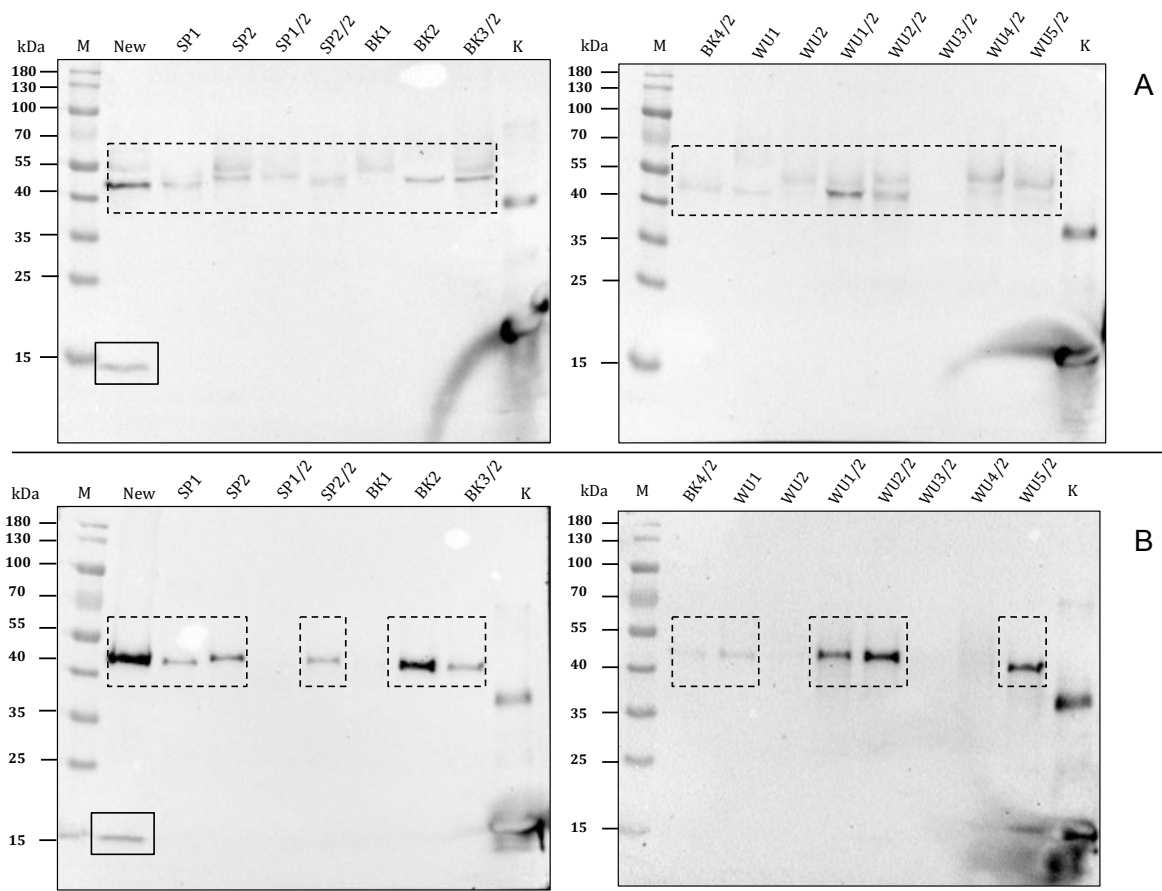


Abbildung 3.48: Immunoblots zum Nachweis von Efb im Zellsediment klinischer *S. aureus*-Isolate in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in Abschnitt 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.47 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden je 10 μ l der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 μ l der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Immunoblots erfolgte wie in Abbildung 3.39 beschrieben. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons C202H7 (α -Efb) verwendet. K: Positivkontrolle (0,5 μ g rekombinantes Efb), New: *S. aureus* Newman. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4. Durchgehender Rahmen: Efb. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1).

ERGEBNISSE

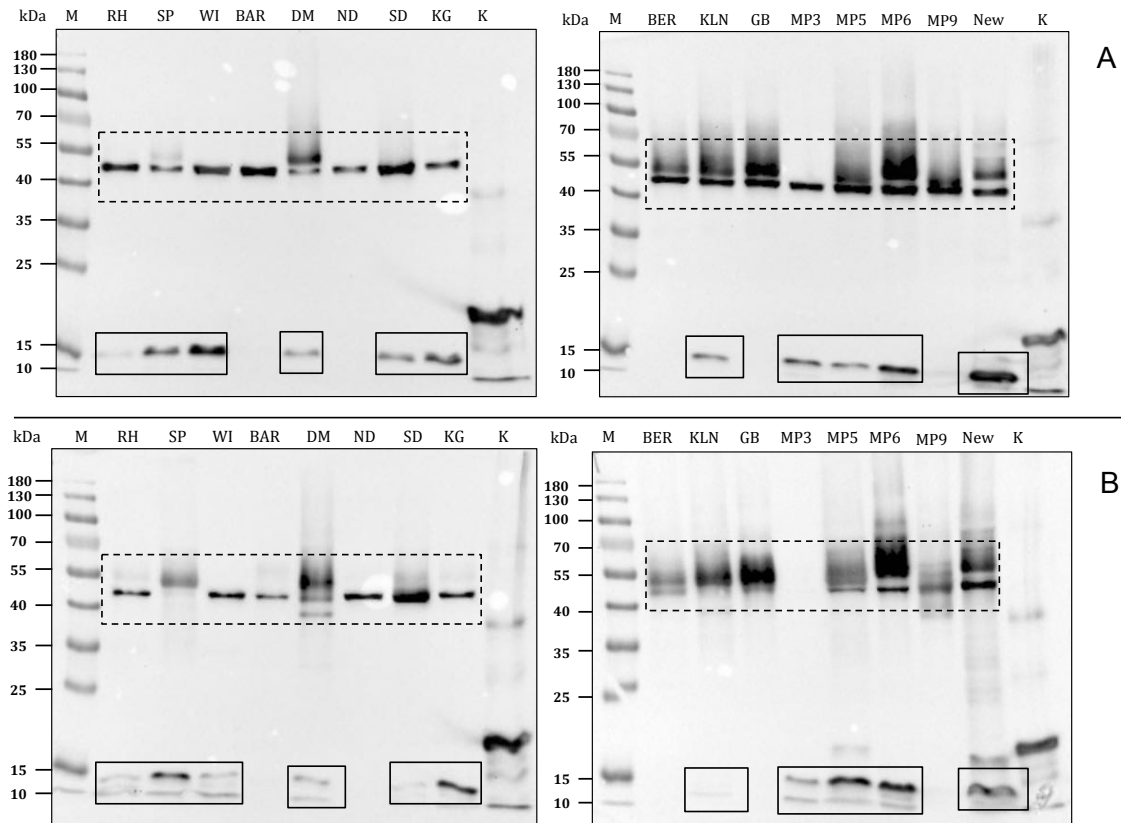


Abbildung 3.49: *Immunoblots zum Nachweis von Efb im RPMI-Kulturüberstand der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP5, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase*

Zur Anfertigung und Entwicklung der Immunoblots siehe Abbildung 3.43. Im Unterschied dazu wurden die Kulturen der exponentiellen Phase nach 3 h 45 geerntet und das Resuspensionsvolumen des Proteinsediments nach folgender Formel berechnet (Volumen in μl = $250 \times \text{OD}_{600}$). Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons C202H7 ($\alpha\text{-Efb}$) verwendet. K: Positivkontrolle (0,5 μg rekombinantes Efb), New: *S. aureus* Newman. Durchgehender Rahmen: Efb Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1). Für Stammbezeichnungen vgl. Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4.

ERGEBNISSE

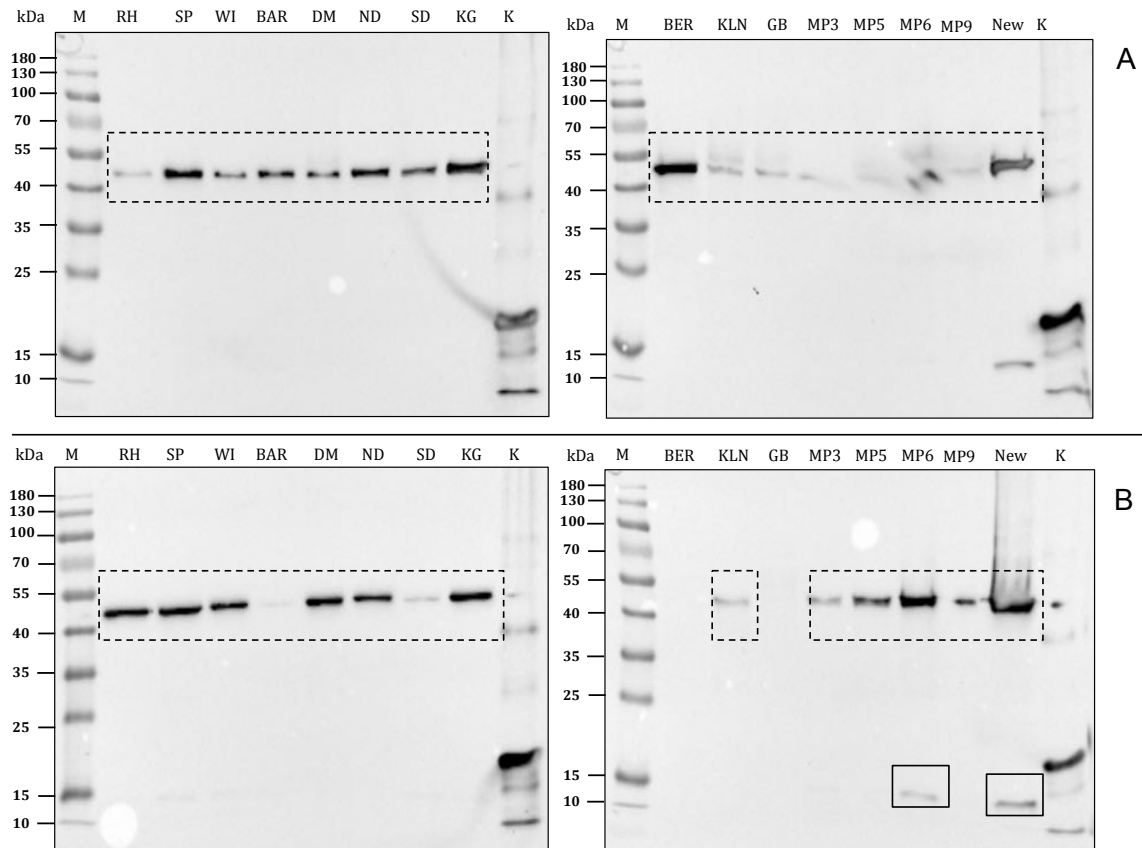


Abbildung 3.50: Immunoblots zum Nachweis von Efb im Zellsediment der MRSA-Referenzstämme sowie der klinischen Isolate MP3, MP5, MP6 und MP9 in der exponentiellen (A) und stationären (B) Phase

Die zellwandassoziierten Proteine wurden wie in 2.16.5 beschrieben aus den Zellsedimenten der Flüssigkulturen aus Abbildung 3.49 extrahiert. In einer 10 % SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl der exponentiellen Phase (A, Proteine aus je ca. 5,4 ml Flüssigkultur) bzw. 5 µl der stationären Phase (B, Proteine aus je ca. 2,7 ml Flüssigkultur) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Färbung und Entwicklung der Immunoblots erfolgte wie in Abbildung 3.39 beschrieben. Als Primär-Ak wurde unverdünnter Zellkulturüberstand des Klons C202H7 (α -Efb) verwendet. K: Positivkontrolle (0,5 µg rekombinantes Efb), New: *S. aureus* Newman. Durchgehender Rahmen: Efb. Gestrichelter Rahmen: unspezifische Antikörperbindungsreaktionen (vgl. 4.1.2.1). Für Stammbezeichnungen vgl. Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4.

In den RPMI-Kulturüberständen war Efb bei folgenden Stämmen in der exponentiellen Phase nachweisbar: *S. aureus* Newman, SP1, SP2, SP1/2, BK1, BK4/2, WU2, WU2/2, WU5/2. In der stationären Phase war Efb in den Kulturüberständen nachweisbar bei *S. aureus* Newman, SP1, SP2, SP2/2, BK3/2, BK4/2, WU2, WU2/2, WU4/2 und WU5/2. In den Kulturüberständen der MRSA-Referenzstämme war Efb in der exponentiellen und stationären Phase bei folgenden Stämmen nachweisbar: RH, SP, WI, DM, SD, KG, KLN, MP3, MP5 und MP6 (vgl. Abbildung 3.47 und Abbildung 3.49; Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4).

In den Zellsedimenten war Efb bei *S. aureus* Newman in der exponentiellen und in der stationären Phase nachweisbar. Bei den übrigen Stämmen konnte Efb nur beim klinischen Stamm MP6 in der stationären Phase nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.48 und Abbildung 3.50; Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 2.1 bis Tabelle 2.4). Eine Übersicht zu den Ergebnissen der α -Efb-*Immunoblots* findet sich in Tabelle 3.5.

3.4 Immunfluoreszenzmikroskopische (IFM) Anwendung der monoklonalen Antikörper im 3D-Kollagengel

Das Wachstum von Staphylokokken in einer 3D-Kollagenmatrix (3D-CoG bzw. 3D-CoG/FP) ähnelt morphologisch den bei einer Dissemination im Wirtsgewebe auftretenden typischen *S. aureus*-Mikrokolonien (Guggenberger *et al.*, 2012). Neben der bereits dargestellten Anwendung der monoklonalen Antikörper im *Immunoblot* (vgl. 3.3.1 bis 3.3.4) sollte im Folgenden deren immunfluoreszenzmikroskopische Anwendbarkeit in einem mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) überprüft werden.

Die monoklonalen Antikörper C231D3 (α -Coa, vgl. 3.2.4.1) und D35B11 (α -vWbp, vgl. 3.2.5.1) erwiesen sich in der IF-Anwendung als nicht spezifisch-reaktiv und damit nicht geeignet für weitere immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Mit den monoklonalen Antikörpern A214C9 (α -Emp) und C202H7 (α -Efb) gelang der spezifische Nachweis ihrer jeweiligen Antigene in einem mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-CoG (3D-CoG/FP) für *S. aureus* Newman (vgl. Abbildung 3.56 und Abbildung 3.71). Böllner (Dissertation, 2015) konnte mit diesen mAKs bereits MRSA-Referenzstämme (vgl. Tabelle 2.2) hinsichtlich ihres Expressions- und Sekretionsverhaltens im 3D-CoG/FP charakterisieren (Böllner, 2015).

In dieser Arbeit wurden weitere klinische MSSA- und MRSA-Isolate (Klinikum Großhadern, München; vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) hinsichtlich Expression und Lokalisation der Proteine Emp und Efb untersucht. Ergänzend hierzu wurden die klinischen Stämme hinsichtlich der Ausbildung der von Guggenberger (2012) beschriebenen Mikrokolonie-assoziierten Strukturen (*Microcolony-associated Meshwork* (vWbp-abhängig) und Pseudokapsel (Coa-abhängig)) charakterisiert. Als Referenzstamm und Positivkontrolle wurde der Stamm *S. aureus* Newman verwendet. Im Folgenden ist zunächst das Wachstum klinischer MSSA- und MRSA-Isolate im 3D-CoG/FP dargestellt. Die folgenden Aufnahmen wurden mittels *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) bei 630-facher Vergrößerung erstellt (vgl. 2.21.3). Unterschiede des Größenmarkers (weißer Balken) sind bedingt durch den Einsatz des optischen Zooms.

3.4.1 Analyse des Wachstums im 3D-CoG/FP

Abbildung 3.53 bis Abbildung 3.55 zeigen das Wachstum klinischer *S. aureus*-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) im 3D-CoG/FP. Als Kontrolle ist in Abbildung 3.51 der bereits von Guggenberger im 3D-CoG/F charakterisierte Stamm *S. aureus* Newman mit den typischen Mikrokolonie-assoziierten Fibrinstrukturen (Pseudokapsel und MAM) dargestellt (Guggenberger *et al.*, 2012). Abbildung 3.52 zeigt im Vergleich die Morphologie einer *S. aureus*-Mikrokolonie in einem 3D-CoG, das nicht mit Fibrinogen und Prothrombin supplementiert wurde. Hier zeigt sich eine irreguläre, weniger kompakte Konformation mit zahlreichen kleineren Zellaggregaten. Die im 3D-CoG/FP beobachteten Fibrinstrukturen fehlen (Guggenberger *et al.*, 2012).

Mit einer Ausnahme (MRSA WU2) bilden alle untersuchten klinischen *S. aureus*-Isolate im 3D-CoG/FP eine Pseudokapsel aus. Ein *Microcolony-associated Meshwork* (MAM) ließ sich hingegen nur bei 3 von 12 untersuchten Stämmen beobachten (MRSA SP2, MSSA BK4/2 und MSSA WU2/2). MRSA WU2 bildete als einziger Stamm keine der beiden Fibrinstrukturen aus.

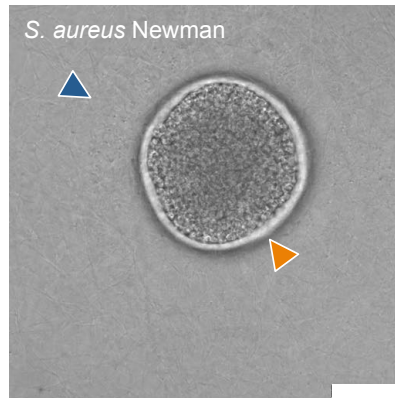


Abbildung 3.51: *S. aureus* Newman-Mikrokolonie im 3D-CoG/FP

S. aureus Newman (ca. 2×10^4 cfu/ml) wurde mit bovinem Kollagen Typ I, MEM und Natriumbikarbonat (7,5 % Lösung) gemischt. 10 μ l dieser Suspension wurden in eine „ μ -Slide-Kammer“ von Ibidi (München) gegeben und zur Gelierung 60 min im Zellkulturbrutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Daraufhin wurde das Gel mit 150 μ l RPMI-Medium („no phenol red“), sowie Fibrinogen 3 mg/ml und Prothrombin 4 μ g/ml überschichtet (vgl. 2.21.1). Die Mikroskopie (Vergrößerung 630 x, weißer Balken 25 μ m, bedingt durch optischen Zoom, CLSM-Hellfeld) erfolgte nach einer weiteren 14 - 16-stündigen Inkubation. Die Pseudokapsel (oranger Pfeil) umgibt die Mikrokolonie als dicht anliegende lichtbrechende Schicht. Das als „Microcolony-associated Meshwork“ (MAM) bezeichnete Fibrinnetz ist mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet .

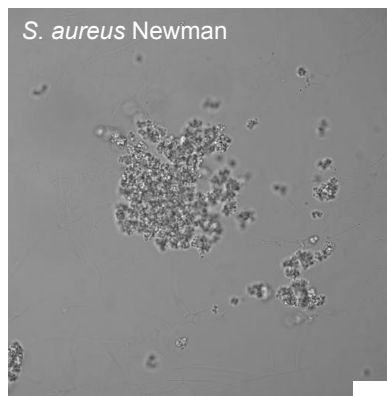


Abbildung 3.52: *S. aureus* Newman-Mikrokolonie im 3D-CoG

Wachstum von *S. aureus* Newman im 3D-CoG ohne Fibrinogen und Prothrombin. Die *S. aureus*-Mikrokolonien bilden lose assoziierte Zellaggregate mit unregelmäßiger Konformation. Die im 3D-CoG/FP ausgebildeten Fibrinstrukturen (Pseudokapsel und MAM) fehlen hier. CLSM-Hellfeld, Vergrößerung 630 x. Weißer Balken: 25 μ m.

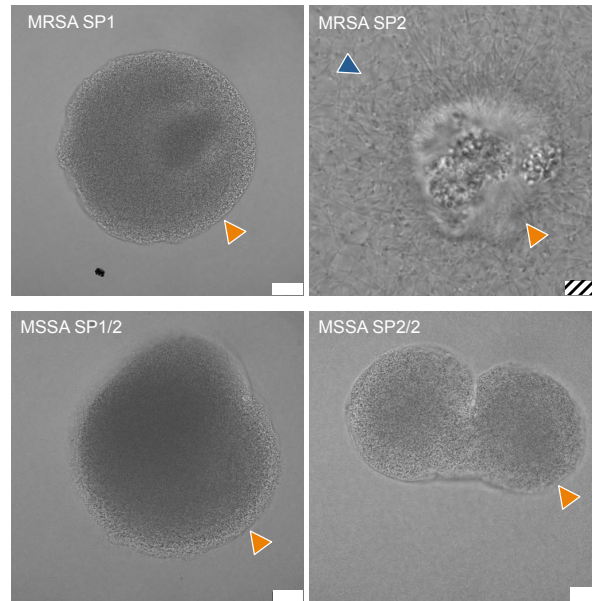


Abbildung 3.53: MRSA und MSSA-Sputumisolat (SP) im 3D-CoG/FP

Die Sputumisolat MRSA SP1, MRSA SP2, MSSA SP1/2 und MSSA SP2/2 bilden kompakte Mikrokolonien mit Pseudokapsel (orange Pfeile). Nur der Stamm MRSA SP2 bildet zusätzlich eine sichtbare MAM (blauer Pfeil). Protokoll wie in Legende zu Abbildung 3.51 beschrieben. CLSM-Hellfeld, Vergrößerung 630 x. Weißer Balken: 25 μm . Gestrichelter Balken: 7,5 μm .

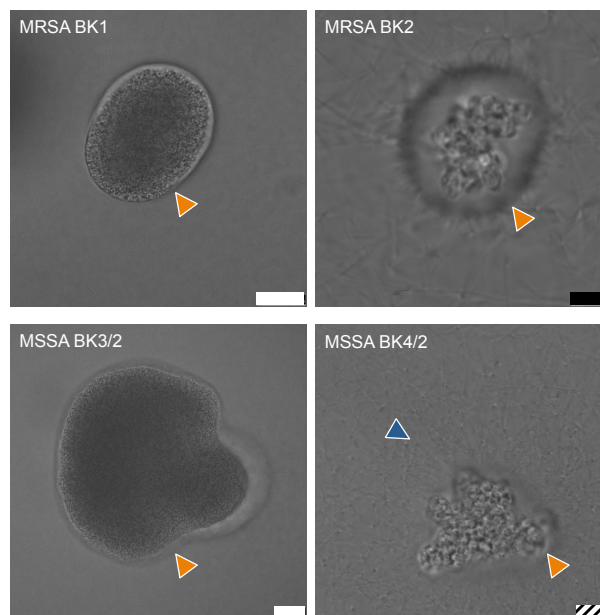


Abbildung 3.54: MRSA- und MSSA-Blutkulturisolate im 3D-CoG/FP

Alle Blutkulturisolate (MRSA BK1, MRSA BK2 sowie MSSA BK3/2 und MSSA BK4/2) bilden kompakte Mikrokolonien mit Pseudokapsel (orange Pfeile). Der Stamm MSSA BK4/2 bildet zusätzlich eine sichtbare MAM (blauer Pfeil). Protokoll wie in Legende zu Abbildung 3.51 beschrieben. CLSM-Hellfeld. Weißer Balken 25 μm . Schwarzer Balken: 5 μm . Gestrichelter Balken: 7,5 μm .

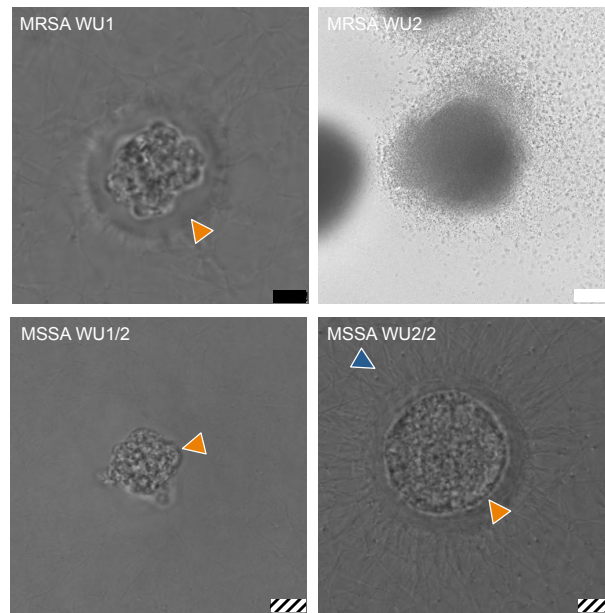


Abbildung 3.55: MRSA- und MSSA-Wundisolate im 3D-CoG/FP

Die Wundisolate MRSA WU1 sowie MSSA WU 1/2 und WU2/2 bilden Pseudokapsel aus (orange Pfeile). Bei MSSA WU2/2 lässt sich zudem ein MAM nachweisen (blauer Pfeil). Bei MRSA WU2 bildet keine der beiden Strukturen (die abgebildete Mikrokolonie erscheint im Desintegrationszustand). Protokoll wie in Legende zu Abbildung 3.51 beschrieben. CLSM-Hellfeld. Weißer Balken: 50 µm. Gestrichelter Balken: 7,5 µm. Schwarzer Balken: 5 µm.

3.4.2 IFM-Anwendung von mAk A214C9 (α -Emp)

Getestet wurde mAk A214C9 (α -Emp) im mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) nach 16 h Wachstum bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Herstellung und immunfluoreszenzmikroskopische Färbung der 3D-CoG/FP ist in den Abschnitten 2.21.1 und 2.21.2 dargestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurden neben dem spezifischen Immunfluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers (Cy3) noch bakterielle DNA mit DAPI (blau) und Zellwandkohlenhydrate mit FITC-Lektin (grün) visualisiert.

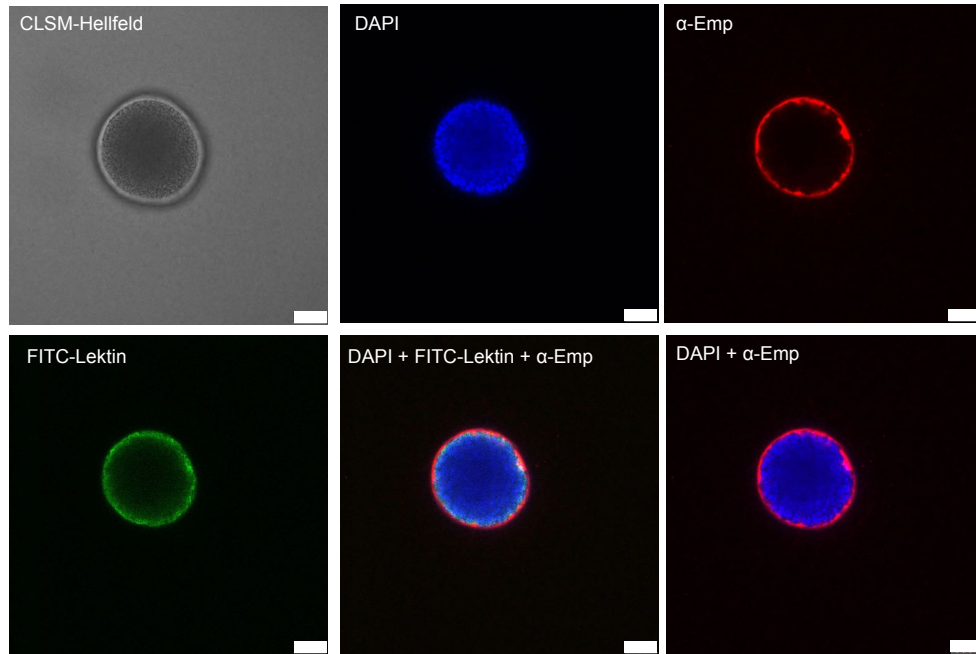


Abbildung 3.56: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in *S. aureus* Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

*Darstellung der Newman-Mikrokolonie in der Durchlichtmikroskopie (CLSM-Hellfeld), DAPI-Färbung (blaue Fluoreszenz der bakteriellen DNA, oben Mitte), indirekte IF-Färbung von Emp mit α -Emp α -Maus IgG Cy3 (rot, oben rechts), *S. aureus*-Zellwandfluoreszenz-Färbung mit FITC-konjugiertem Lektin (FITC-Lektin), sowie Dreifach- bzw. Doppelfluoreszenzüberlagerungen (unten Mitte und unten rechts). Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) bei 630-facher Vergrößerung aufgenommen. Weißer Balken: 25 μ m.*

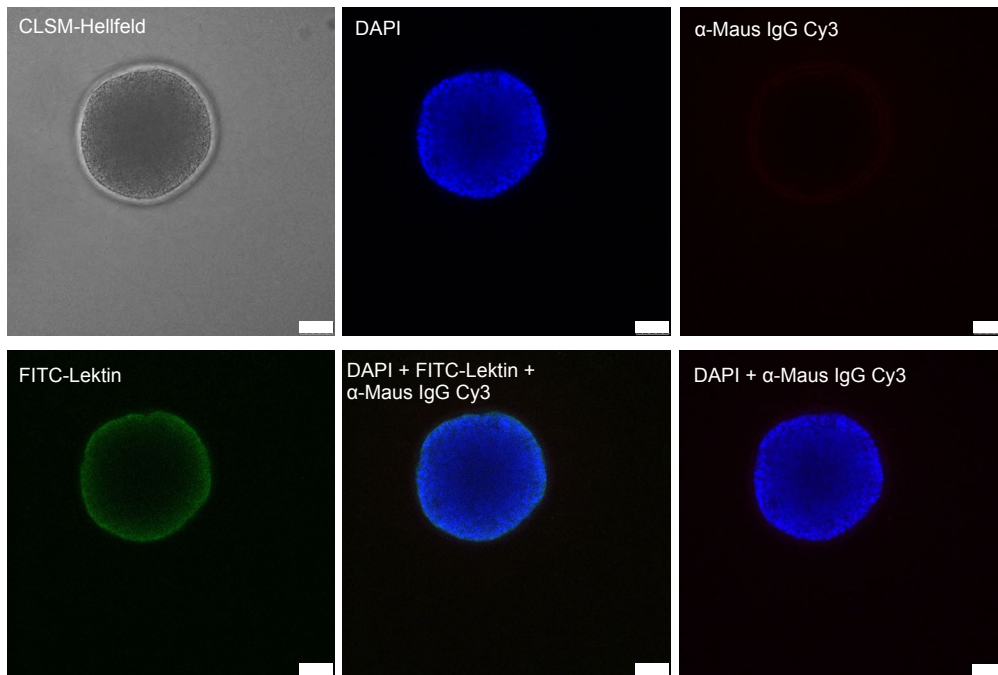


Abbildung 3.57: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des α -Maus IgG Cy3-Hintergrundsignals in *S. aureus* Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP (Negativkontrolle)

Um Kreuzreaktionen und Interferenzen des sekundären Antikörpers auszuschließen, wurde als Negativkontrolle eine immunfluoreszenzmikroskopische Färbung mit Cy3-konjugiertem α -Maus IgG ohne Primärantikörper durchgeführt (α -Maus IgG Cy3). Die weiteren Färbungen erfolgten nach dem Protokoll in der Legende zu Abbildung 3.56. Im Cy3-Kanal (α -Maus IgG Cy3) zeigt sich ein kaum sichtbar schwaches Hintergrundsignal (rot). Weißer Balken: 25 µm.

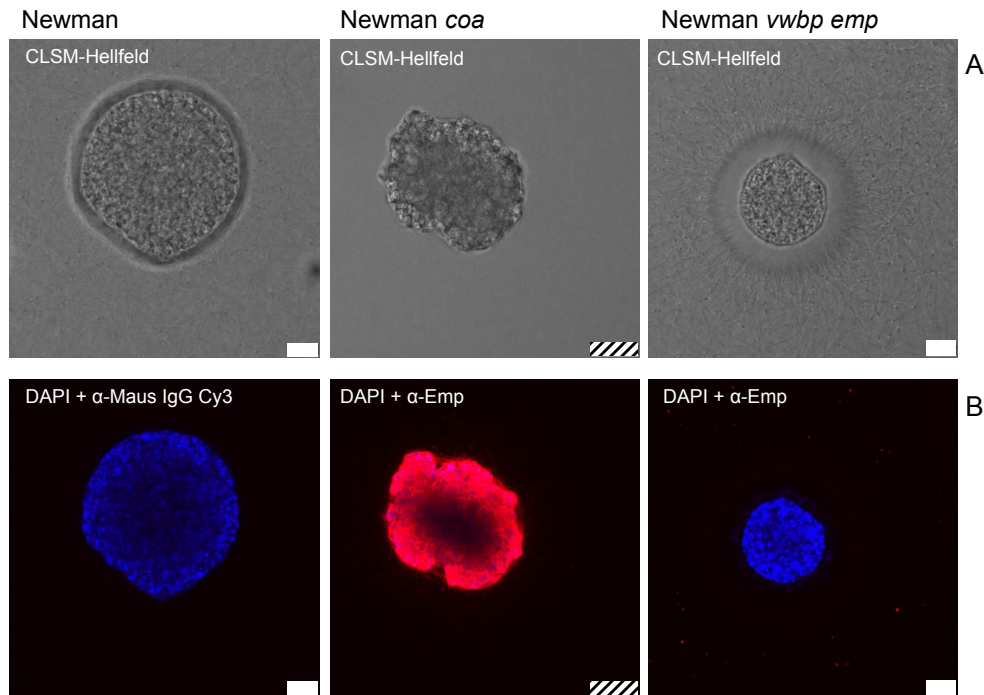


Abbildung 3.58: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in den Mutanten Newman coa und Newman vwbp emp im 3D-CoG/FP

Eine weitere Bestätigung, dass das immunfluoreszenzmikroskopische Signal auf eine spezifische Detektion von Emp durch mAk A214C9 (α -Emp) zurückzuführen ist ergab sich aus dem Vergleich der Immunfluoreszenz-Signale der Mutanten *S. aureus* Newman coa und *S. aureus* Newman vwbp emp. Ein deutliches α -Emp-Signal war bei der coa-Mutante, nicht jedoch bei der vwbp emp-Mutante nachweisbar (vgl. Tabelle 2.1). Als Negativkontrolle wurde *S. aureus* Newman mit α -Maus IgG Cy3 gefärbt (DAPI + α -Maus IgG Cy3) (vgl. auch Abbildung 3.57). A: Durchlichtmikroskopie (CLSM-Hellfeld), B: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: DAPI (blau), α -Emp (rot). Weißer Balken: 10 µm. Schraffierter Balken: 25 µm (Unterschiede in den Balkenlängen sind bedingt durch optischen Zoom).

Nach der Bestätigung der Spezifität von mAk A214C9 (α -Emp) im 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) bei *S. aureus* Newman sollten mehrere klinische MSSA und MRSA-Isolate auf die Produktion von Emp hin untersucht werden. Dazu wurden je zwei MRSA- bzw. MSSA-Isolate aus Sputum/endotrachealer Absaugung (SP), Blutkultur (BK) und Wundabstrich (WU) verwendet (Quelle: Klinikum Großhadern München, vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4).

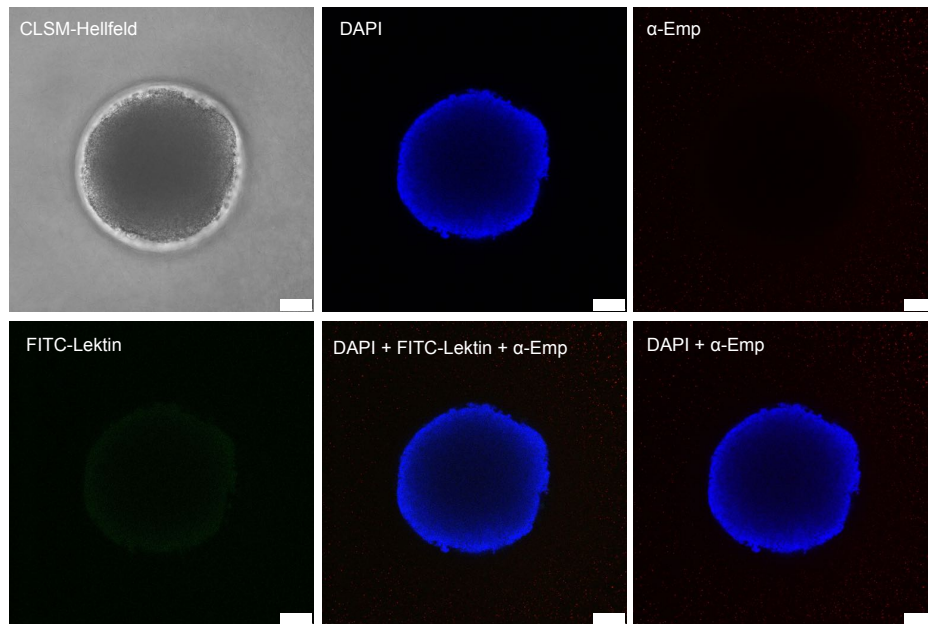


Abbildung 3.59: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA SP1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 µm.

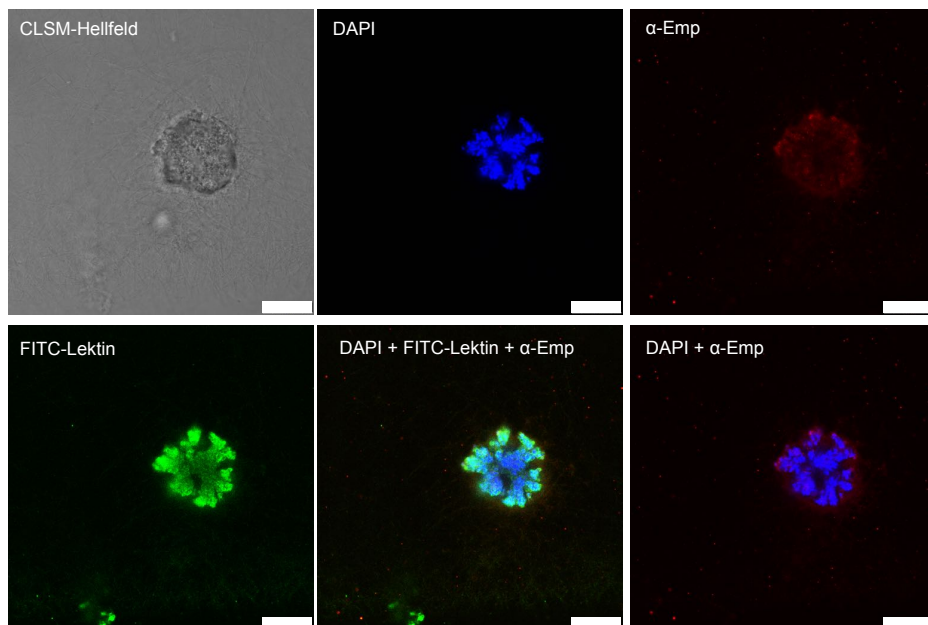


Abbildung 3.60: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA SP2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Emp ließ sich im Cy3-Kanal als diskretes, über die Kolonie verteiltes IF-Signal detektieren. Weißer Balken: 25 µm.

ERGEBNISSE

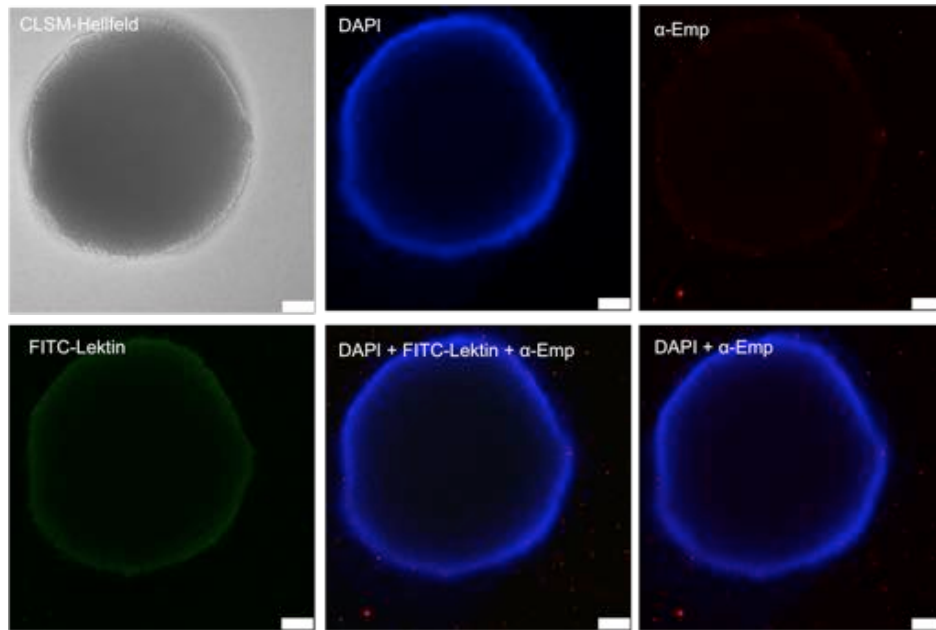


Abbildung 3.61: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA SP1/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 μ m.

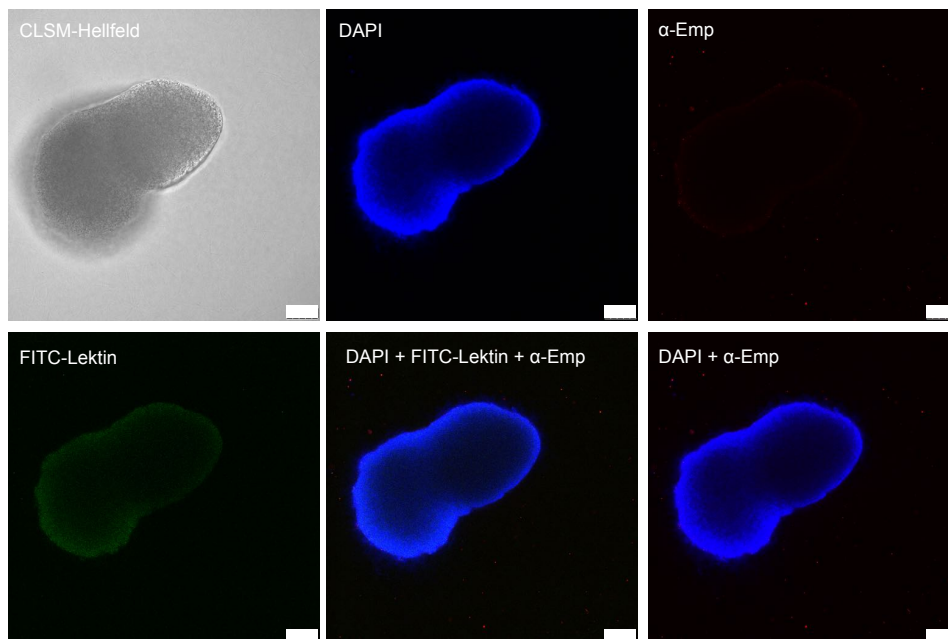


Abbildung 3.62: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA SP2/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 μ m.

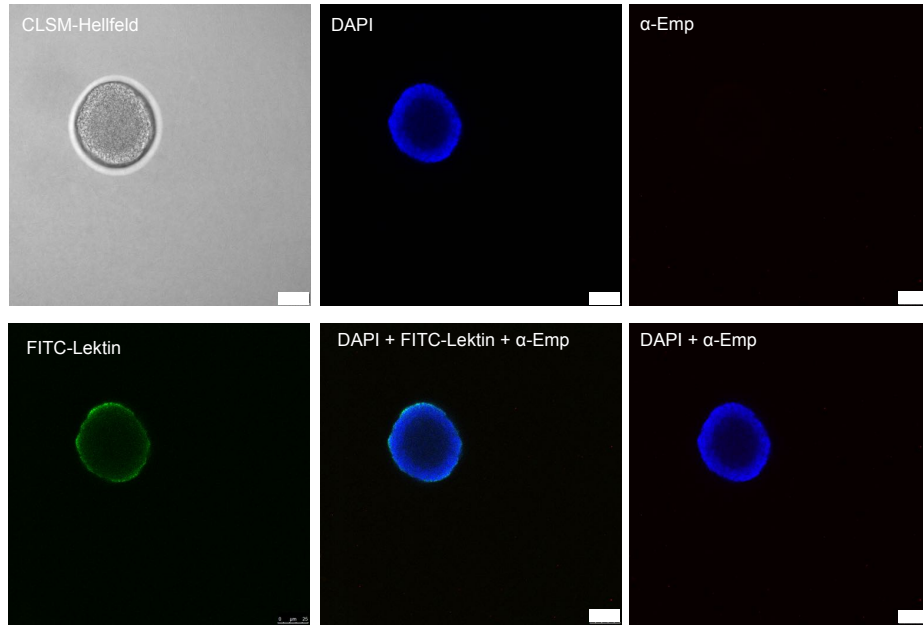


Abbildung 3.63: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA BK1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 µm.

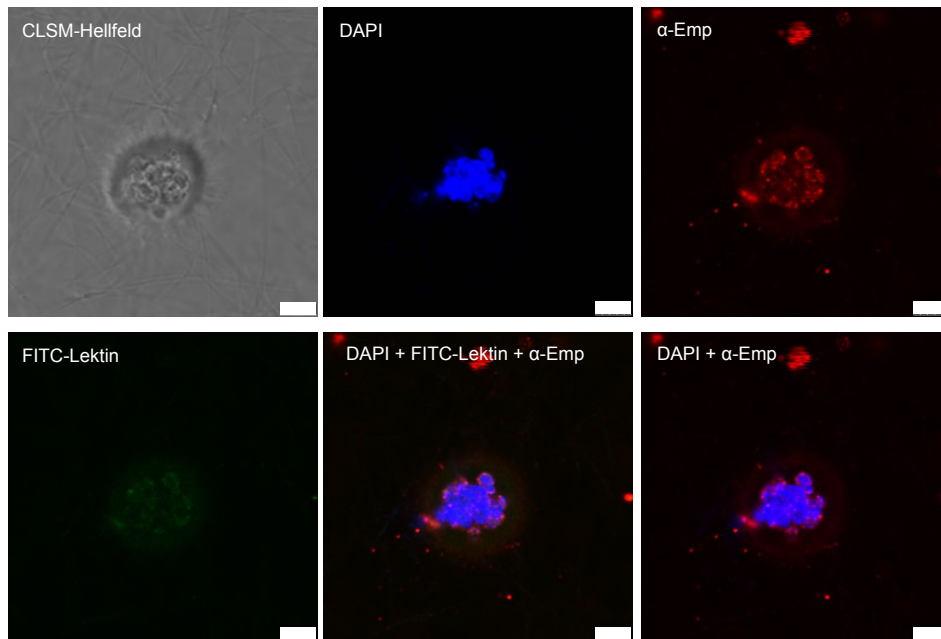


Abbildung 3.64: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA BK2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Bei MRSA BK1 zeigte sich im Cy3-Kanal (α-Emp) ein deutliches IF-Signal, das auf eine Lokalisation von Emp im Bereich der bakteriellen Zellwand hindeutet. Weißer Balken: 5 µm.

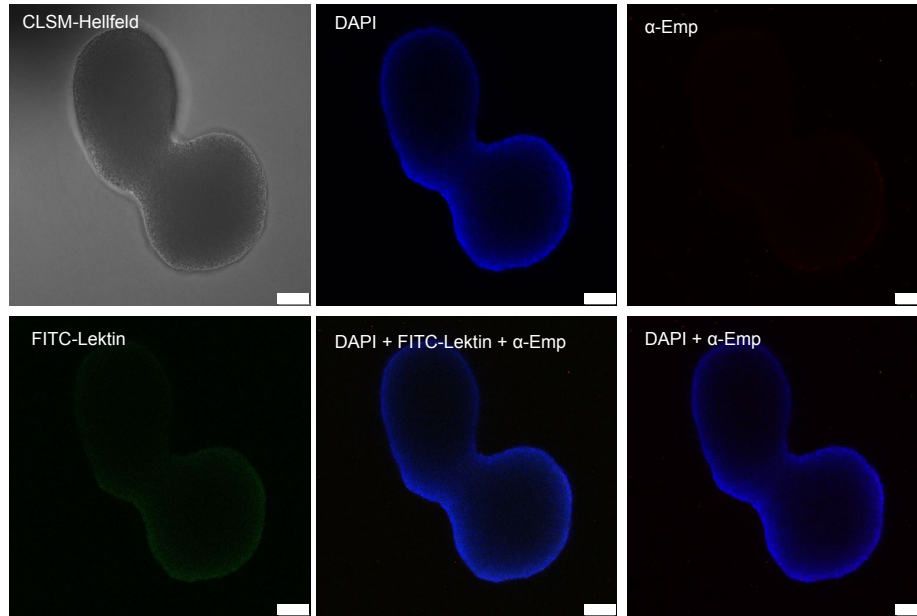


Abbildung 3.65: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA BK3/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 µm.

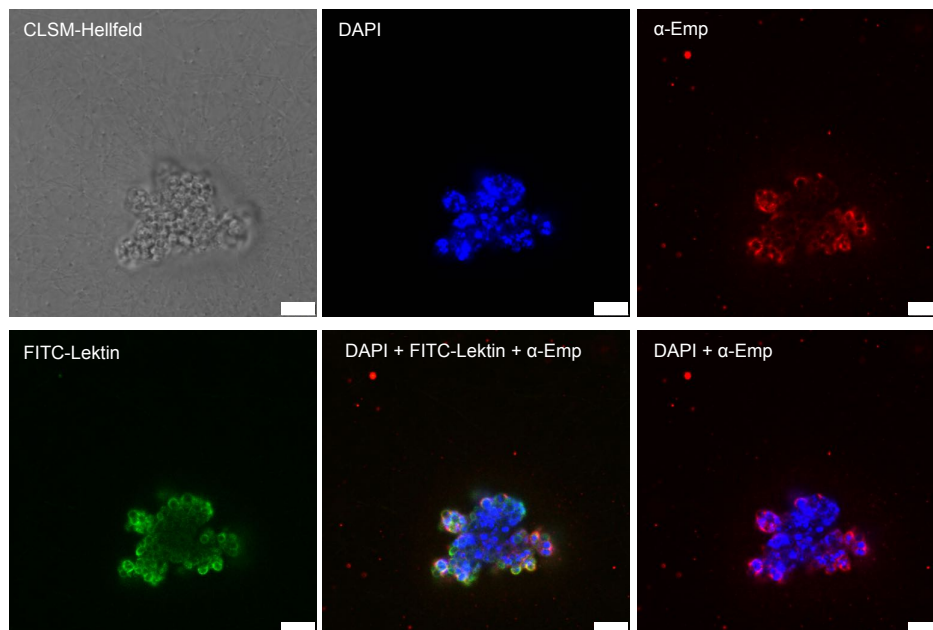


Abbildung 3.66: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA BK4/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Emp im Bereich der bakteriellen Zellwand (vgl. Cy3-Signal (α-Emp) und FITC-Lektin). Weißer Balken: 7,5 µm.

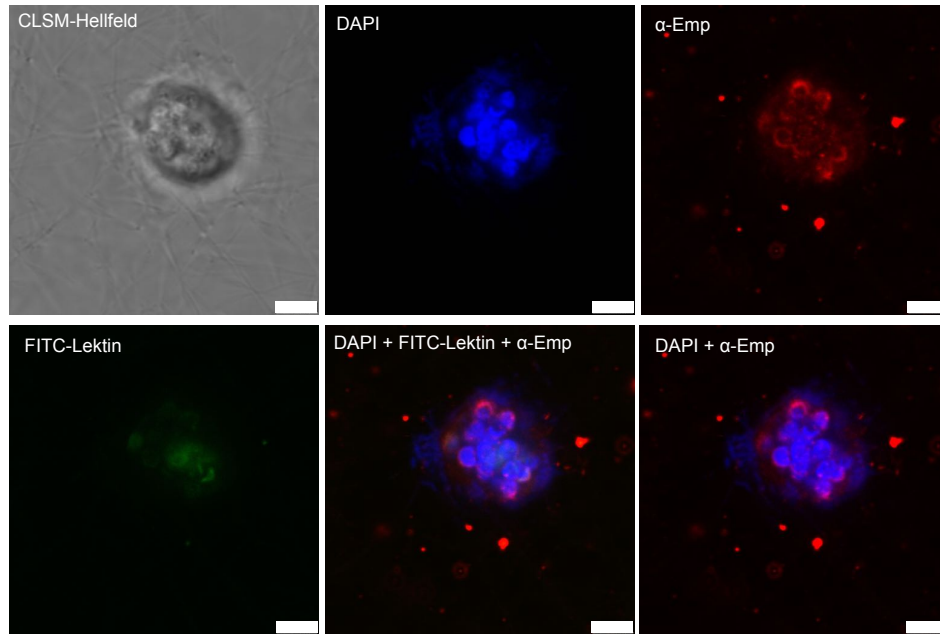


Abbildung 3.67: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA WU1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Nachweis von Emp im Bereich der bakteriellen Zellwand (vgl. α -Emp und FITC-Lektin). Weißer Balken: 5 μ m.

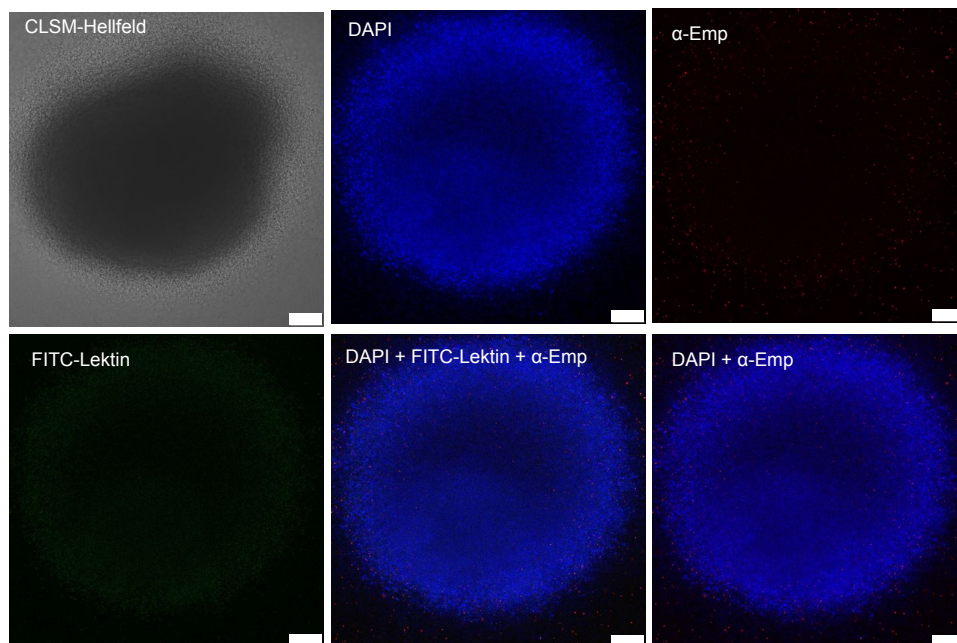


Abbildung 3.68: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MRSA WU2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 μ m.

ERGEBNISSE

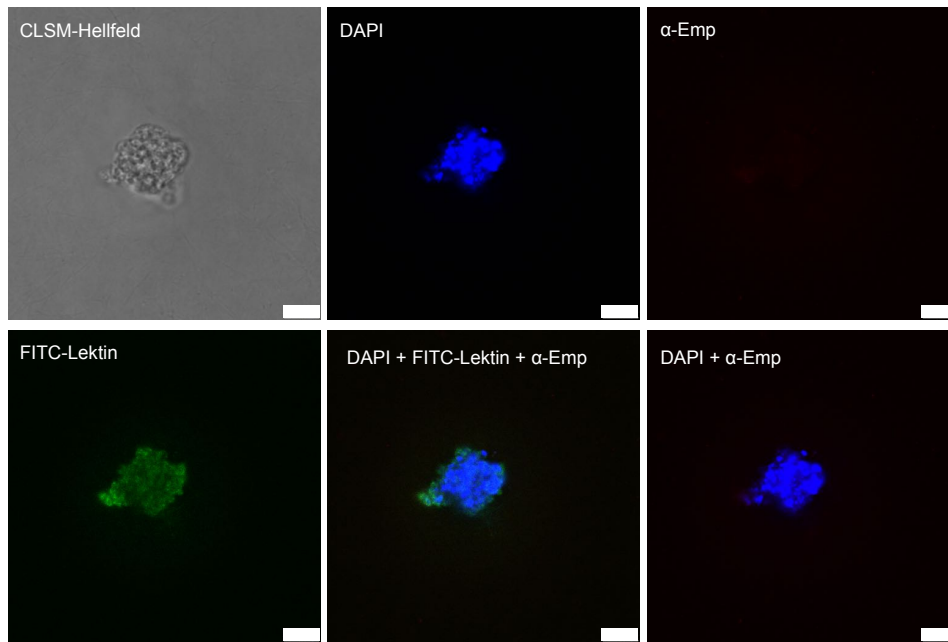


Abbildung 3.69: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA WU1/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 7,5 μ m.

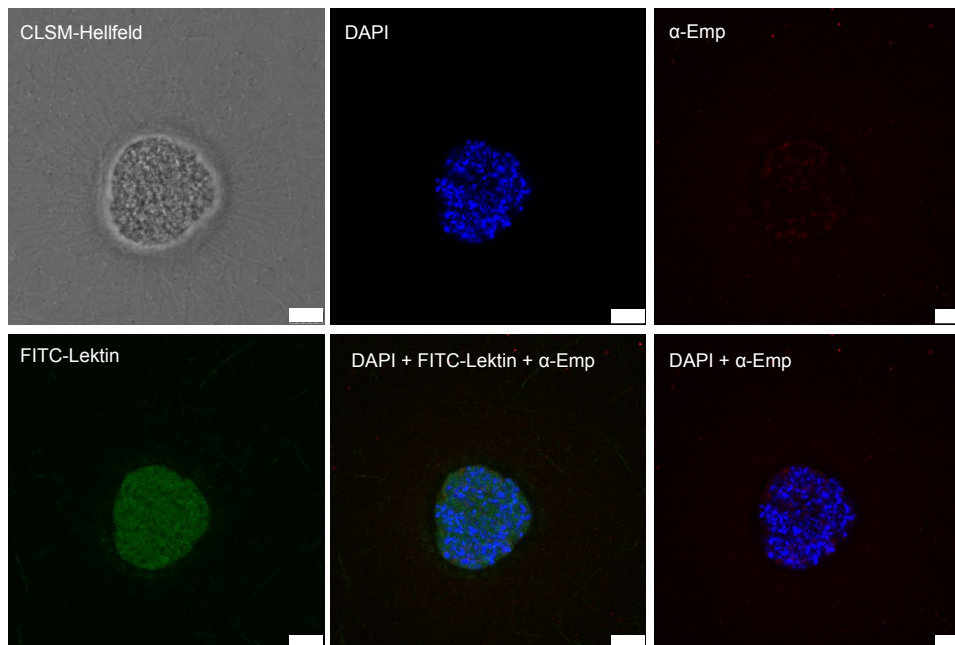


Abbildung 3.70: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Emp in MSSA WU2/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.56 beschrieben. Kein Nachweis eines Emp-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 7,5 μ m.

3.4.3 IFM-Anwendung von mAk C202H7 (α -Efb)

Getestet wurde mAk C202H7 (α -Efb) im mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) nach 16 h Wachstum der im Abschnitt 3.4.1 untersuchten *S. aureus*-Stämme bei 37 °C und 5 % CO₂. Zu Herstellung und immunfluoreszenzmikroskopischen Färbung der 3D-Kollagengele vgl. Abschnitte 2.21.1 und 2.21.2. Soweit nicht anders dargestellt, wurden neben dem spezifischen Immunfluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers (Cy3, rot) noch bakterielle DNA mit DAPI (blau) und Zellwandkohlenhydrate mit FITC-Lektin (grün) visualisiert.

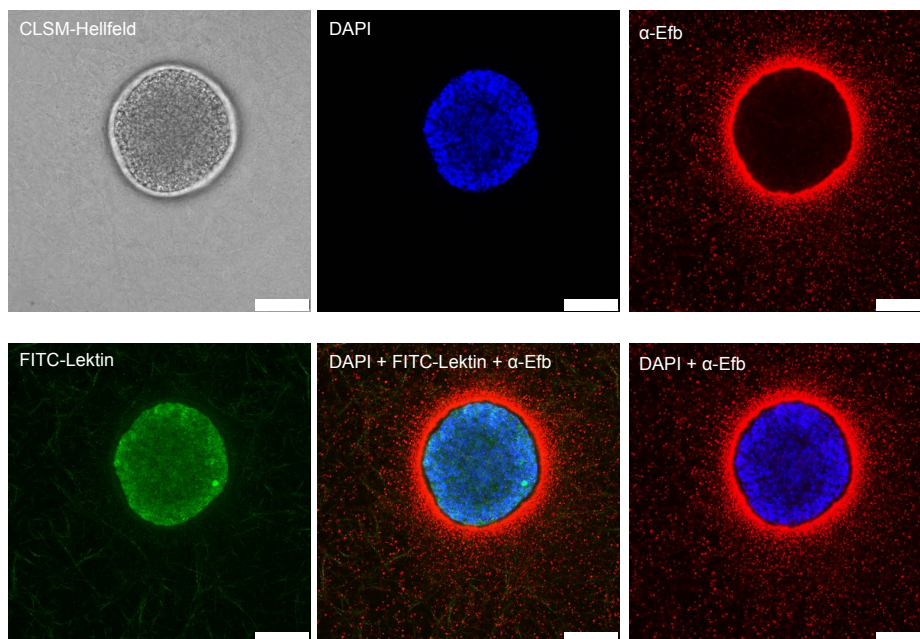


Abbildung 3.71: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in *S. aureus* Newman-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Darstellung der Mikrokolonie in der Durchlichtmikroskopie (CLSM-Hellfeld), DAPI-Färbung (blaue Fluoreszenz der bakteriellen DNA, oben Mitte), indirekte Immunfluoreszenz (IF)-Färbung von Efb mit α -Efb (mAk C202H7) und α -Maus IgG Cy3, *S. aureus*-Zellwandfluoreszenz-Färbung mit FITC-konjugiertem Lektin (FITC-Lektin), sowie Dreifach- bzw. Doppelfluoreszenzüberlagerungen (unten Mitte und rechts). Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mittels „Confocal Laser Scanning Microscopy“ (CLSM) bei 630-facher Vergrößerung aufgenommen. Weißer Balken: 25 μ m.

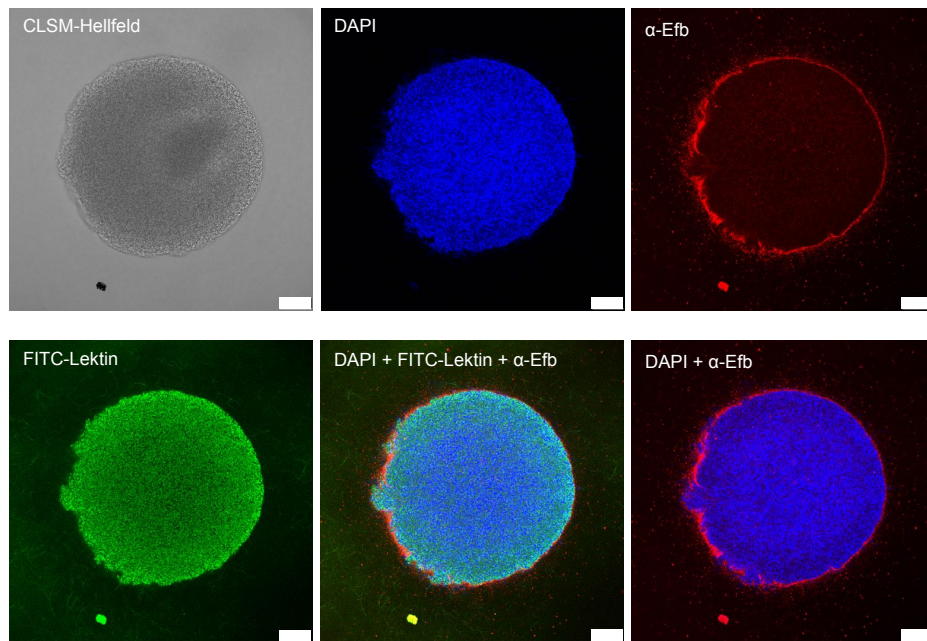


Abbildung 3.72: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA SP1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb im Bereich der Pseudokapsel der Mikrokolonie (α -Efb). Weißer Balken: 25 μ m.

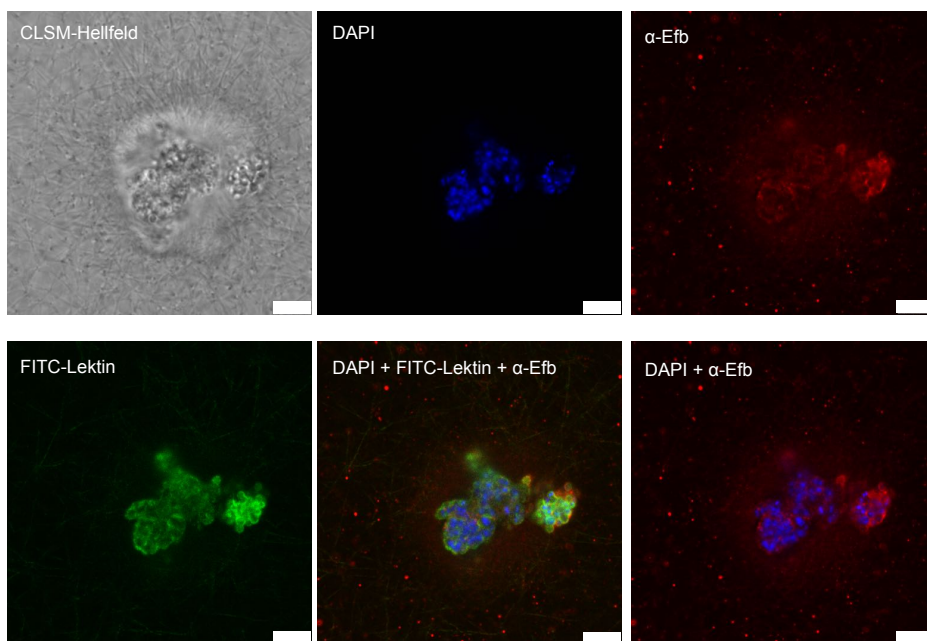


Abbildung 3.73: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA SP2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Schwacher immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb (α -Efb). Weißer Balken: 7,5 μ m.

ERGEBNISSE

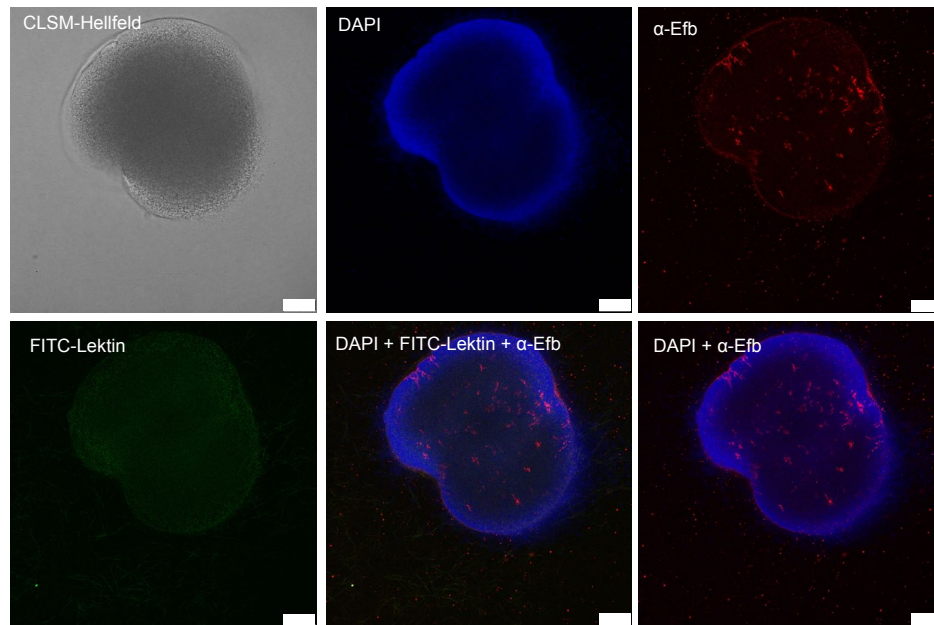


Abbildung 3.74: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA SP1/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben). Kein Nachweis eines Efb-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 µm.

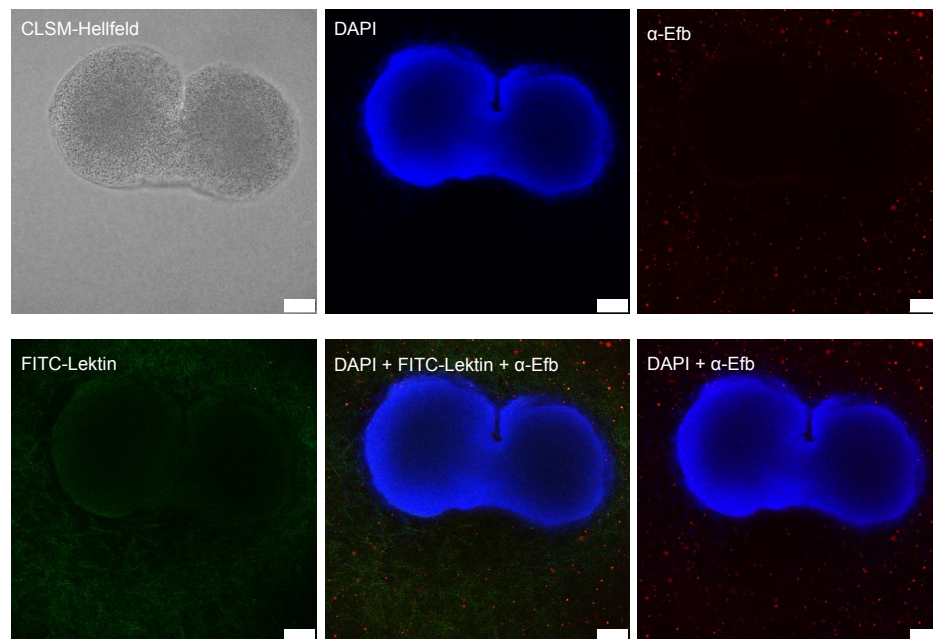


Abbildung 3.75: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA SP2/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Kein Nachweis eines Efb-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 25 µm.

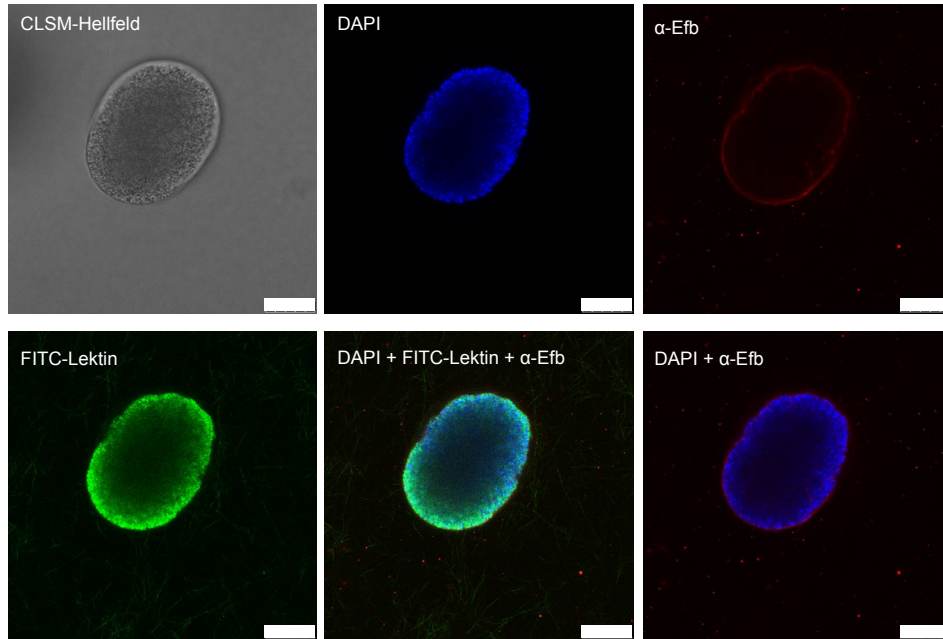


Abbildung 3.76: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA BK1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Diskreter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb im Bereich der Pseudokapsel (α -Efb). Weißer Balken: 25 μ m.

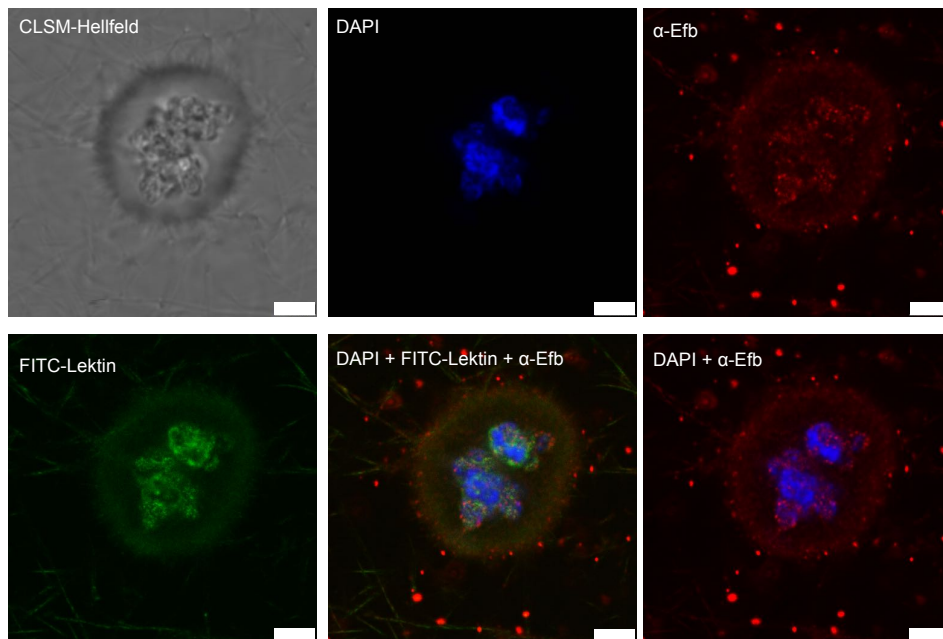


Abbildung 3.77: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA BK2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Diskreter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb im Bereich der Pseudokapsel und in der Kolonie (α -Efb), sehr schwaches Signal). Weißer Balken: 5 μ m.

ERGEBNISSE

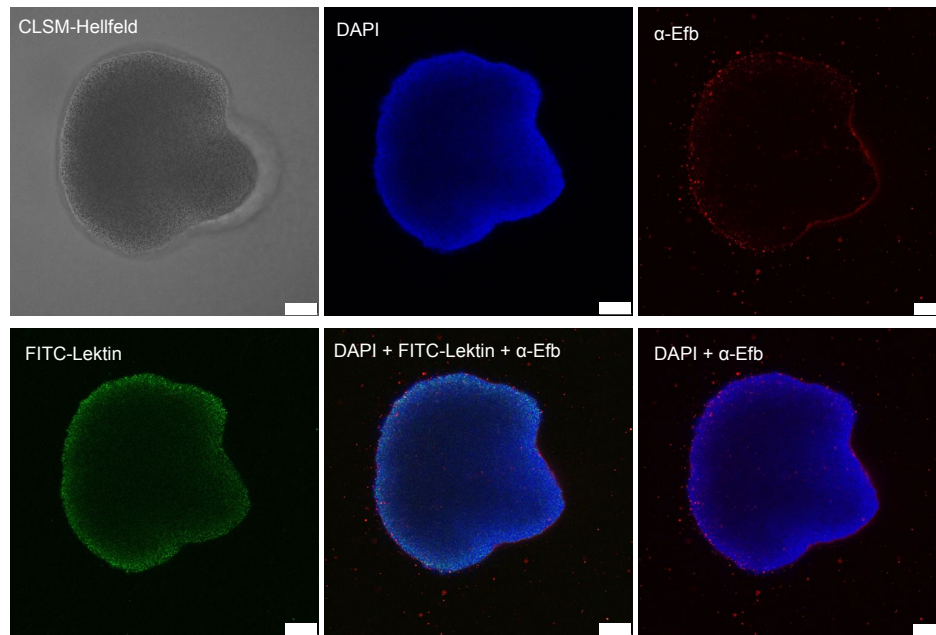


Abbildung 3.78: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA BK3/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Diskreter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb im Bereich der Pseudokapsel (α -Efb). Weißer Balken: 25 μ m.

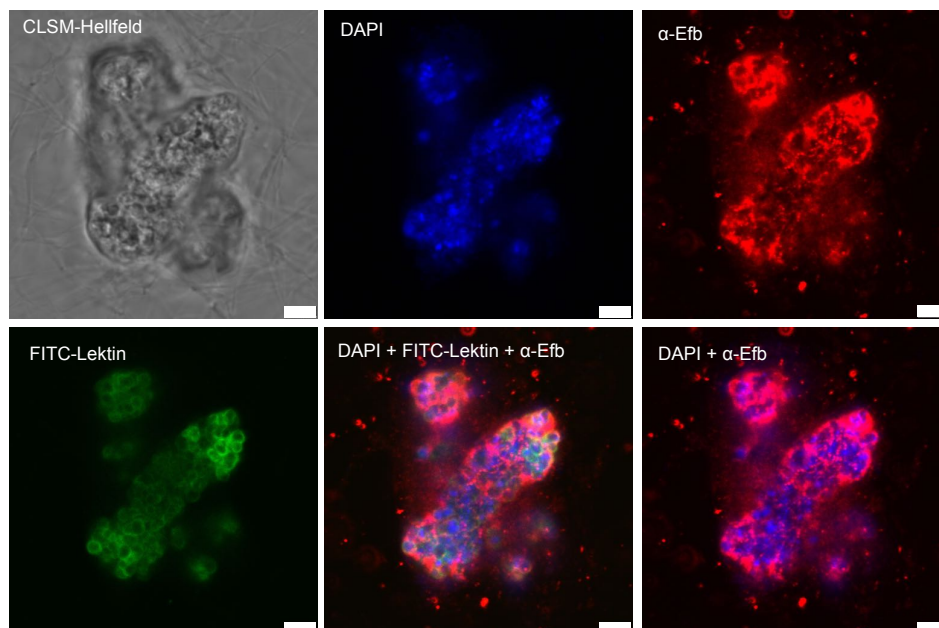


Abbildung 3.79: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA BK4/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Deutlicher immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb (α -Efb). Weißer Balken: 5 μ m.

ERGEBNISSE

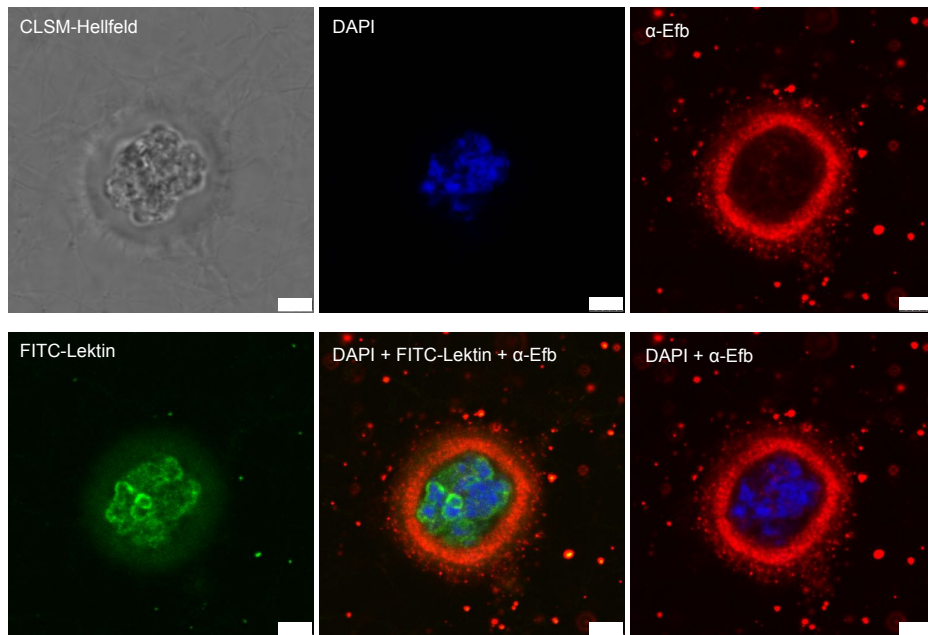


Abbildung 3.80: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA WU1-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Deutlicher immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in Assoziation zur Pseudokapsel (α -Efb). Weißer Balken: 5 μ m.

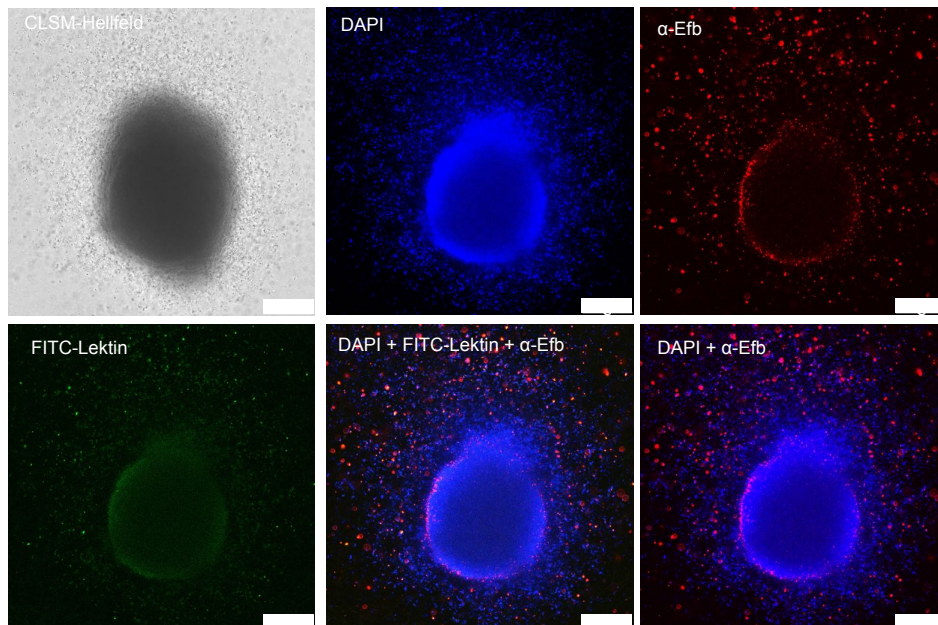


Abbildung 3.81: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MRSA WU2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Kein Nachweis eines Efb-spezifischen IF-Signals. Weißer Balken: 50 μ m.

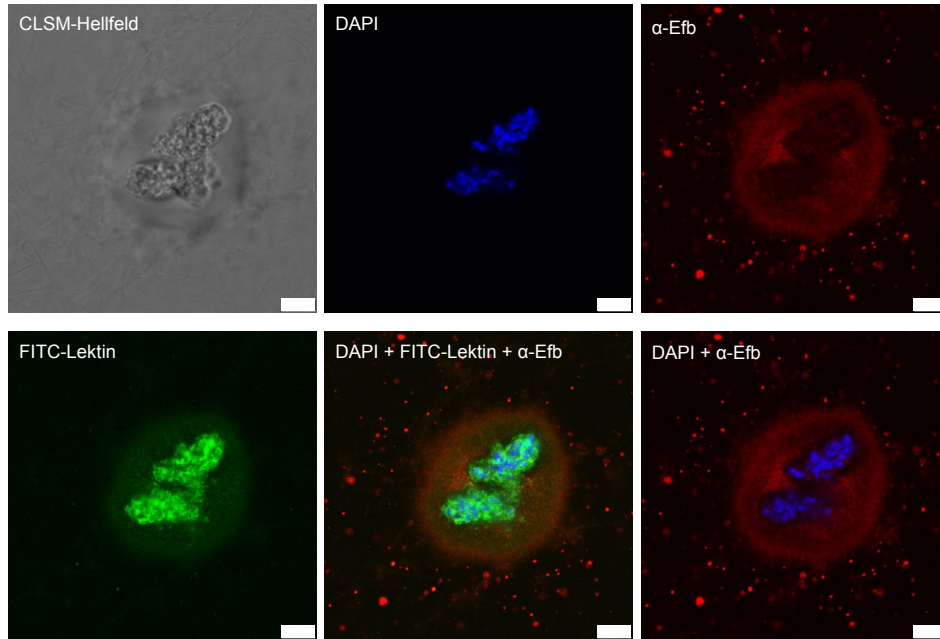


Abbildung 3.82: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA WU1/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Schwacher immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in Assoziation zur Pseudokapsel (α -Efb). Weißer Balken: 7,5 μ m.

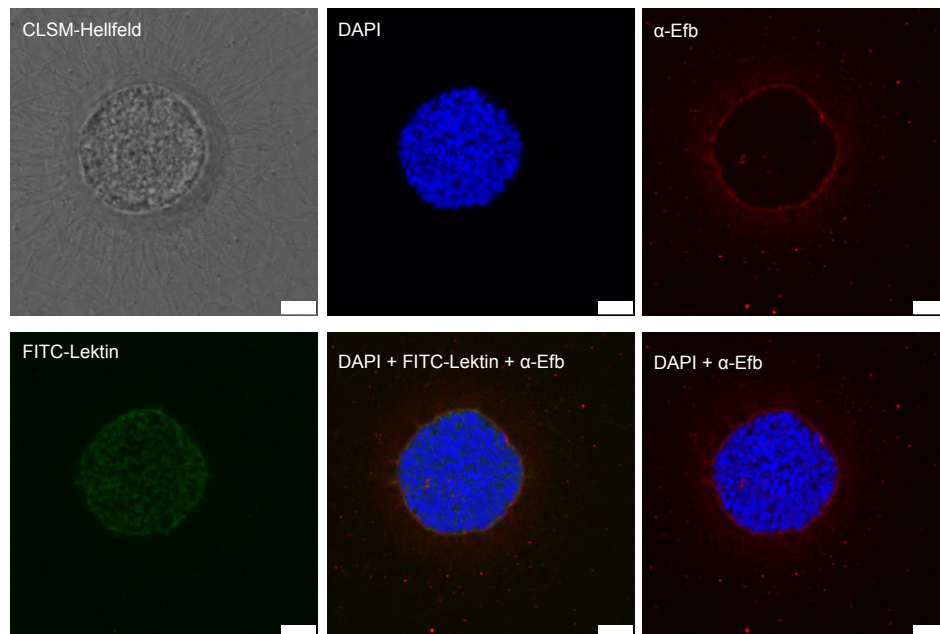


Abbildung 3.83: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Efb in MSSA WU2/2-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP

Färbung und Mikroskopie erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 3.71 beschrieben. Schwacher immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in Assoziation zur Pseudokapsel (α -Efb). Weißer Balken: 7,5 μ m.

3.5 Tabellarische Übersicht der Immundetektionsergebnisse mit den monoklonalen Antikörpern (α -Coa, α -vWbp, α -Emp und α -Efb) für diverse *S. aureus*-Stämme

Tabelle 3.2: Übersicht zum Nachweis von Coa im Immunoblot mittels mAk C231D3 (α -Coa)

Stämme	IB-ÜS _{exp}	IB-ÜS _{stat}	IB-Sediment _{exp}	IB-Sediment _{stat}	PC/MAM
Newman	++	-	-	-	PC/MAM
Newman <i>coa</i>	-	-	-	-	-/MAM
Newman <i>vwbp emp</i>	++	n.u.	n.u.	n.u.	PC/-
klinische Isolate (vgl. Tabelle 3.3)	-	-	-	-	vgl. Tabelle 3.3

IB: Immunoblot; ÜS: TCA-gefällte Proteine aus RPMI-Kulturüberstand; Sediment: Extrahierte Proteine des Zellsediments; exp: exponentielle Phase; stat: stationäre Phase; ++: deutliche Bande; + schwache Bande; -: keine Bande nachweisbar; n.u.: nicht untersucht. PC: Pseudokapsel; MAM: Microcolony-associated Meshwork.

Nur während der exponentiellen Wachstumsphase konnte Coa im RPMI-Kulturüberstand der Stämme *S. aureus* Newman und Newman *vwbp emp* nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.2). Wahrscheinlich wird die Koagulase während der stationären Wachstumsphase proteolytisch degradiert. Bei der Mutante Newman *coa* war Coa weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase nachweisbar. Bei keinem der untersuchten klinischen MSSA- und MRSA-Isolate war Coa nachweisbar (vgl. Tabelle 3.2).

ERGEBNISSE

Tabelle 3.3: Übersicht zum Nachweis von vWbp im *Immunoblot* mittels mAk D35B11 (α -vWbp)

Stämme	IB-ÜS _{exp}	IB-ÜS _{stat}	IB-Sediment _{exp}	IB-Sediment _{stat}	PC/MAM
Newman	++	-	-	-	PC/MAM
Newman <i>coa</i>	++	n.u.	n.u.	n.u.	-/MAM
Newman <i>vwbp emp</i>	-	-	-	-	PC/-
RH		-	-	-	n.u.
SP		-	-	-	n.u.
WI	+	-	-	-	n.u.
BAR	-	-	-	-	n.u.
DM	-	-	-	-	n.u.
ND	-	-	-	-	n.u.
SD	-	-	-	-	n.u.
KG	+	+	-	-	n.u.
BER	-	-	-	-	n.u.
KLN	-	-	-	-	n.u.
GB	-	-	-	-	n.u.
MP3	-	-	-	-	n.u.
MP6	-	-	-	-	n.u.
MP9	-	-	-	-	n.u.
SP1	-	-	-	-	PC/-
SP2	-	-	-		PC/MAM
SP1/2	-	-	-	-	PC/-
SP2/2	-	-	-	-	PC/-
BK1	-	-	-	-	PC/-
BK2	-	-	-	-	PC/-
BK3/2	-	-	-	-	PC/-
BK4/2	-	-	-	-	PC/MAM
WU1	-	-	-	-	PC/-
WU2	-	-	-	-	-/-
WU1/2	-	-	-	-	PC/-
WU2/2	-	-	-	-	PC/MAM
WU3/2	-	-	-	-	n.u.
WU4/2	-	-	-	-	n.u.

Legende siehe Tabelle 3.2

Da der mAk D35B11 (α -vWbp) nur im *Immunoblot*, aber nicht in der Immunfluoreszenz mit intakten Staphylokokken-Zellen (3D-CoG/FP) Reaktivität zeigte, sind in Tabelle 3.3 nur die *Immunoblot*-Ergebnisse zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.4: Übersicht zum Nachweis von Emp im *Immunoblot* und in Mikrokolonien im 3D-CoG/FP mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (mAk A214C9, α -Emp)

Stämme	IB-ÜS _{exp}	IB-ÜS _{stat}	IB-Sediment _{exp}	IB-Sediment _{stat}	IF-3D-CoG/FP	PC/MAM
Newman	++	++	++	++	++	PC/MAM
Newman <i>coa</i>	++	n.u.	n.u.	n.u.	++	-/MAM
Newman <i>vwbp emp</i>	-	-	-	-	-	PC/-
RH	-	-	-	+	n.u.	n.u.
SP	+	+	-	++	n.u.	n.u.
WI	+	++	+	+	n.u.	n.u.
BAR	+	+	-	-	n.u.	n.u.
DM	+	-	-	+	n.u.	n.u.
ND	+	+	-	-	n.u.	n.u.
SD	-	-	-	-	n.u.	n.u.
KG	+	+	-	+	n.u.	n.u.
BER	-	-	-	-	n.u.	n.u.
KLN	-	+	-	+	n.u.	n.u.
GB	-	-	-	-	n.u.	n.u.
MP3	-	-	-	-	n.u.	n.u.
MP6	-	-	-	-	n.u.	n.u.
MP9	-	-	-	-	n.u.	n.u.
SP1	-	-	-	-	-	PC/-
SP2	-	-	-	-	+	PC/MAM
SP1/2	-	-	-	-	-	PC/-
SP2/2	-	-	-	-	-	PC/-
BK1	-	-	-	-	-	PC/-
BK2	+	+	+	+	+	PC/-
BK3/2	-	-	-	-	-	PC/-
BK4/2	+	+	+	-	+	PC/MAM
WU1	-	+	+	-	+	PC/-
WU2	-	-	-	-	-	-/-
WU1/2	-	-	-	-	-	PC/-
WU2/2	-	-	-	-	-	PC/MAM
WU3/2	-	-	-	-	n.u.	n.u.
WU4/2	-	-	-	-	n.u.	n.u.

IB: Immunoblot; ÜS: TCA-gefällte Proteine aus RPMI-Kulturüberstand; Sediment: extrahierte Proteine des Zellsediments; exp: exponentielle Phase; stat: stationäre Phase; (++) : deutliche Bande; (+) schwache Bande; (-): keine Bande nachweisbar; IF: IF-Signal im 3D-CoG/FP nach 16 h; (++) : deutliches Signal; (+) schwaches Signal; (-): kein Signal bzw. Signal, das sich nicht vom Hintergrundsignal der Negativkontrolle differenzieren ließ. n.u.: nicht untersucht. PC: Pseudokapsel; MAM: Microcolony-associated Meshwork.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.5 Übersicht zum Nachweis von *S. aureus* Efb im Immunoblot und in Mikrokolonien im 3D-CoG/FP mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (mAk C202H7, α -Efb)

Stämme	IB-ÜS _{exp}	IB-ÜS _{stat}	IB-Sediment _{exp}	IB-Sediment _{stat}	IF-3D-CoG/FP	PC/MAM
Newman	++	++	+	+	++	PC/MAM
Newman <i>coa</i>	++	n.u.	n.u.	n.u.	+++	-/MAM
Newman <i>vwbp emp</i>	++	n.u.	n.u.	n.u.	-	PC/-
RH	+	+	-	-	n.u.	n.u.
SP	+	++	-	-	n.u.	n.u.
WI	++	+	-	-	n.u.	n.u.
BAR	-	-	-	-	n.u.	n.u.
DM	+	+	-	-	n.u.	n.u.
ND	-	-	-	-	n.u.	n.u.
SD	+	+	-	-	n.u.	n.u.
KG	+	++	-	-	n.u.	n.u.
BER	-	-	-	-	n.u.	n.u.
KLN	+	+	-	-	n.u.	n.u.
GB	-	-	-	-	n.u.	n.u.
MP3	+	+	-	-	n.u.	n.u.
MP5	+	++	-	-	n.u.	n.u.
MP6	++	++	-	+	n.u.	n.u.
MP9	-	-	-	-	n.u.	n.u.
SP1	+	+	-	-	+	PC/-
SP2	+	+	-	-	+	PC/MAM
SP1/2	+	-	-	-	-	PC/-
SP2/2	-	+	-	-	-	PC/-
BK1	+	-	-	-	+	PC/-
BK2	-	-	-	-	+	PC/-
BK3/2	-	+	-	-	+	PC/-
BK4/2	+	+	-	-	++	PC/MAM
WU1	-	-	-	-	++	PC/-
WU2	+	+	-	-	-	-/-
WU1/2	-	-	-	-	+	PC/-
WU2/2	++	++	-	-	+	PC/MAM
WU3/2	-	-	-	-	n.u.	n.u.
WU4/2	-	+	-	-	n.u.	n.u.
WU5/2	+	++	-	-	n.u.	n.u.

Legende siehe Tabelle 3.4

4 Diskussion

Staphylococcus aureus ist ein vielseitiger, fakultativ pathogener Mikroorganismus, der die moderne Medizin im klinischen wie ambulanten Bereich gleichermaßen herausfordert. Ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren sowie vielfältige Resistenzmechanismen gegen gängige Antibiotika sind ursächlich für die zahlreichen Manifestationsformen *S. aureus*-bedingter Infektionen (Lowy, 1998, Howden *et al.*, 2010). Sezernierte Proteine aus der SERAM-Gruppe (u. a. Coa, vWbp, Efb, Emp und Eap) gehören zu den Hauptakteuren im Infektionsgeschehen (Chavakis *et al.*, 2005). Sie vermitteln die Adhärenz von Staphylokokken an Proteine der extrazellulären Matrix (Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen u. a.) und ermöglichen *S. aureus* die Persistenz im Wirtsgewebe (Chavakis *et al.*, 2005). Als multifunktionelle Virulenzfaktoren greifen sie darüber hinaus in die Blutgerinnungskaskade ein (Coa und vWbp) (Friedrich *et al.*, 2003, Bjerketorp *et al.*, 2004). Die dadurch entstehenden Fibrinnetzstrukturen bieten *S. aureus* einen „mechanischen“ Schutz vor dem Zugriff und der Elimination durch Neutrophile Granulozyten (Guggenberger *et al.*, 2012). Die Proteine Efb und Eap zeigen neben ihren adhäsiven Eigenschaften auch eine potente inhibitorische Aktivität gegen Faktoren des Komplementsystems und damit gegen die Opsonisierung (Hammel *et al.*, 2007, Woehl *et al.*, 2014).

Cheng *et al.* konnten zeigen, dass sich mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen Coa und vWbp eine protektive Wirkung in einem Maus-Infektionsmodell erzielen ließ (Cheng *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde mit denselben Antikörpern in immunhistochemischen Mikrotom-Schnitten von Maus-Nieren-Abszessen eine Kollokalisierung der entsprechenden Proteine mit Fibrin/Prothrombin nachgewiesen (Cheng *et al.*, 2010). Guggenberger konnte mit polyklonalem Kaninchen-Serum in einem mit Fibrinogen supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/F) die Proteine Coa und Emp von *S. aureus* Newman im Bereich der Pseudokapsel detektieren. Die Pseudokapsel ist eine Fibrin-Struktur, die einer *S. aureus*-Mikrokolonie im 3D-CoG/F „mechanischen“ Schutz vor dem Zugriff Neutrophiler Granulozyten bietet und in Abhängigkeit von der Koagulase Coa gebildet wird (Guggenberger *et al.*, 2012). Die Bildung des sich distal um die Mikrokolonie anschließenden *Microcolony associated Meshwork* (MAM) wird dagegen durch die Anwesenheit der Koagulase vWbp vermittelt.

Die weitere Aufklärung der funktionellen Bedeutung der SERAMs mit deren assoziierten Strukturen (MAM und Pseudokapsel) im Gesamtzusammenhang der Pathogenese ist nicht nur in klinisch-therapeutischer Hinsicht von größter Bedeutung. In der Diskussion um protektive Immunität und Impfstoffentwicklung gegen *S. aureus* spielen die Staphylokokken-Koagulasen Coa und vWbp als Antigene eine wichtige Rolle, um die Bildung der Mikrokolonie-assozierten Fibrin-Strukturen (MAM und Pseudokapsel) zu verhindern (Missiakas und Schneewind, 2016). Gemessen an der großen Anzahl *S. aureus*-bedingter Infektionen ist es auch aus ökonomischer Sicht dringend geboten, Pathomechanismen aufzuklären und aus deren Kenntnis innovative therapeutische Strategien zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

4.1 Generierung muriner monoklonaler Antikörper gegen SERAMs von *Staphylococcus aureus* Newman

Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum entsprechend immunisierter Tiere gewonnen und zeichnen sich dadurch aus, dass sie Antikörper enthalten, die verschiedene Epitope eines Antigens erkennen können. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern ist die Herstellung monoklonaler Antikörper wesentlich aufwendiger und zeitintensiver. Sie werden nach der von Köhler und Milstein 1975 publizierten Hybridoma-Technik generiert und richten sich im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern hoch-spezifisch gegen ein Epitop eines Antigens. mAbs werden von immortalisierten Hybridomazell-Klonen in den Zellkultur-Überstand sezerniert und können daraus in potentiell unbegrenzter Menge gewonnen und aufgereinigt werden (Köhler und Milstein, 1975). Seit der Erstbeschreibung ihrer Herstellung ist das Anwendungsspektrum monoklonaler Antikörper immens gewachsen. Sie werden in Therapie und Diagnostik verschiedener Erkrankungen eingesetzt und kommen in der biomedizinischen Forschung in vielfältiger Weise zur Anwendung. Gegen einige Proteine und Virulenzfaktoren von *S. aureus* existieren bereits unterschiedliche monoklonale Antikörper (Lorenz *et al.*, 2011, Oesterreich *et al.*, 2014, van den Berg *et al.*, 2015). Für Proteine aus der SERAM-Gruppe (Coa, vWbp, Emp, Efb) standen zum Zeitpunkt der Erarbeitung der hier vorgelegten Ergebnisse noch keine monoklonalen Antikörper zur Verfügung. Für Analysen im *Immunoblot* und zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion wurden vorwiegend polyklonale Antiseren verwendet (Thomer *et al.*, 2016).

In Anbetracht der ätiologischen Bedeutung sezernierter *S. aureus*-Proteine als Virulenzfaktoren wurden in dieser Arbeit mehrere mAks gegen die SERAMs Coa, vWbp, Emp und Efb hergestellt. Die generierten Antikörper wurden charakterisiert (Isotypisierung, *Immunoblot*) und soweit möglich in einem mit Prothrombin und Fibrinogen supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion der entsprechenden Proteine in *S. aureus*-Mikrokolonien eingesetzt. Darüber hinaus wurden im Rahmen einer Immunisierung mit TCA-gefällten Kulturüberstandsproteinen weitere mAks gegen sezernierte *S. aureus*-Proteine gewonnen. Zwei dieser mAks konnten durch massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) Staphylokokken-Proteinen zugeordnet werden, die nicht zur SERAM-Gruppe gehören: Ein mA zeigte spezifische Reaktivität gegen das *Immunodominant surface antigen A* (IsaA). Ein weiterer war gegen die Glycerolesterhydrolase (Lipase) gerichtet. Weitere in dieser Arbeit generierte monoklonale Antikörper wurden nicht weiter charakterisiert.

Einige der in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper wurden in Kooperation mit S. Böllner in ihrer Dissertation zur Charakterisierung von MRSA-Referenzstämmen verwendet (α -Coa, α -vWbp, α -Emp, α -Efb) (Böllner, 2015).

4.1.1 Auswahl und Herstellung der Antigene für die Immunisierung

Sezernierte Proteine (SERAMs) finden sich bei einigen *S. aureus*-Stämmen in relativ großer Menge im bakteriellen Kulturüberstand (Herbert *et al.*, 2010). *S. aureus* Newman weist diesbezüglich eine Besonderheit auf: Durch eine Punktmutation im Gen *saeS*, das für die Histidin-Kinase kodiert und wichtiger Bestandteil des globalen SaeRS-Zweikomponenten-Regulationssystems ist, ist es zu einem Aminosäureaustausch in der Sensordomäne des Proteins (Leu18 \rightarrow Pro18) gekommen und damit verbunden zu einer erhöhten Kinase-Aktivität (Mainiero *et al.*, 2010). Dies hat eine im Vergleich zum Wildtyp übermäßig hohe Expression von Genen zur Folge, die unter Kontrolle dieses Regulationssystems stehen wie z. B. *coa*, *efb* und *fnbp* (Mainiero *et al.*, 2010). Aus diesem Grund schien es sinnvoll, die Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* Newman über eine TCA-Fällung aufzukonzentrieren und in dieser Form als Antigene für die Immunisierung von BALB/c-Mäusen zu verwenden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass damit im günstigsten Fall eine große Menge an Antikörpern gegen unterschiedliche, auch unbekannte sezernierte Proteine hergestellt werden können. Die entsprechenden Antigene müssen jedoch im Nachhinein zugeordnet und identifiziert werden. Dies

konnte bei zwei monoklonalen Antikörpern mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF) der reaktiven Proteine erreicht werden (α -IsaA und α -Lip). Dazu wurden die im *Immunoblot* positiven Proteinbanden über einen Abgleich der Protein-Größenmarker den entsprechenden Banden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) zugeordnet. Die so identifizierten Proteine wurden aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF) identifiziert. Da das Bandenspektrum der im SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) aufgetrennten Proteine sehr dicht ist, ist die genaue Identifizierung der entsprechenden Bande jedoch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Eine eingehendere Untersuchung der beiden darüber identifizierten Antikörper würde die Überprüfung der Reaktivität gegenüber entsprechend rekombinant hergestellten Proteinen erfordern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Um die Ausbeute an monoklonalen Antikörpern gegen gewünschte SERAMs zu erhöhen, wurden interessierende Proteine rekombinant hergestellt (Coa, vWbp, Emp, Efb). Im Gegensatz zur ersten Methode (Immunisierung mit TCA-gefällten *S. aureus*-Kulturüberstandsproteinen) weist diese Vorgehensweise den Vorteil auf, dass damit spezifische Antikörper gegen ein bereits bekanntes Antigen gewonnen werden. Problematisch kann jedoch sein, dass Hybridoma-Klone, die stabil positive Reaktionen gegen das rekombinante Protein aus *E. coli* zeigen, das entsprechende Protein von *S. aureus* nicht erkennen. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen sind monoklonale Antikörper häufig gegen Strukturen gerichtet, die im rekombinanten Protein, nicht jedoch im natürlichen Protein vorhanden sind. Beispiele dafür wären der dem rekombinanten Protein zur affinitätschromatographischen Aufreinigung angefügte Hexahistidyl-Rest ((His)₆-Tag) oder die Faktor Xa-Schnittstelle (dient der Entfernung des (His)₆-Tags vom rekombinanten Protein), sofern sie vor der Immunisierung nicht vom rekombinanten Protein entfernt wurden (biotechnologisches Problem). Andererseits kann sich das Epitop des rekombinanten Proteins im Rahmen der allogenen Expression (hier *E. coli*) strukturell derart von der natürlichen/isogenen Form unterscheiden, dass dieses aufgrund der Spezifität des Antikörpers nicht mehr erkannt wird. Eine weitere Erklärung wäre, dass der Antikörper das natürlich gefaltete Protein zwar erkennen würde, dieses jedoch aufgrund der methodischen Vorgehensweise (z. B. Denaturierung) nicht in der verwendeten Probe vorhanden ist und deshalb nicht nachgewiesen werden kann (sequentiellles Epitop versus diskontinuierliches Epitop).

In dieser Arbeit konnten die Proteine Coa, vWbp, Emp und Efb erfolgreich rekombinant in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden. Das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) wurde zwar in den Expressionsvektor kloniert, konnte jedoch als Protein nicht eindeutig nachgewiesen werden (wahrscheinlich ein *Codon usage*-Problem). Die amplifizierten PCR-Produkte der entsprechenden Gene wurden dazu über TA-Klonierung in geeignete Zwischenvektoren kloniert und anschließend über die Restriktionserkennungssequenzen für BamHI und Sall in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Zielvektors pET-28a ligiert. Nach Überprüfung der Korrektheit der Sequenz durch Sanger-Sequenzierung, wurden die entsprechenden Vektoren in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformiert. Auf die erfolgreiche Induktion der Transkription mit IPTG folgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall. Dabei wurden die Proteine in ihrer nativen Form erhalten. Die sich nun in der löslichen Fraktion befindlichen Proteine konnten affinitätschromatographisch mittels Ni-NTA-Technologie aufgereinigt werden. Durch die Expression im Plasmid pET-28a wiesen die rekombinanten Proteine N-terminal einen Hexahistidyl-Rest ((His)₆-Tag) auf, der selektiv an Agarose-immobilisierte Ni-NTA bindet. Die Aufreinigung gestaltete sich für die Proteine Coa, vWbp und Efb bezüglich Menge und Reinheit problemlos, sodass eine Verwendung dieser Proteine für eine Immunisierung in Frage kam. Das rekombinante Emp konnte jedoch nur in sehr geringen Mengen produziert und aufgereinigt werden, sodass es für eine Immunisierung nicht verwendet wurde. Das selbe Problem trat beim Versuch der Produktion und Aufreinigung von Eap auf. Auch hier war eine ausreichende Produktion nicht möglich. Eine fehlende bzw. nicht ausreichende Expression kann verschiedene Ursachen haben. Die Induktionsbedingungen (Temperatur, Zeit, IPTG-Konzentration) haben Einfluss auf die korrekte Faltung und erfolgreiche Produktion des rekombinanten Proteins. Mit der Variation dieser Bedingungen konnte jedoch schon in der Produktionsanalyse von vWbp die Menge an produziertem Protein nicht merklich beeinflusst werden. Aufwendige Produktionsoptimierungen wurden deshalb im Fall von Emp und Eap nicht durchgeführt. Mögliche Erklärungen für die geringe bis ausbleibende Produktion von Emp und Eap könnten die Toxizität der Produkte oder der proteolytische Abbau falsch gefalteter Proteine in *E. coli* sein.

4.1.2 Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden insgesamt 4 Zellfusionen (A, B, C, D) durchgeführt. Dazu wurden je drei weibliche BALB/c-Mäusen mit verschiedenen

Antigenen immunisiert. Die erste Immunisierung (A) wurde mit TCA-gefällten Kulturüberstandspoteinen (SERAM-Gruppe) aus der exponentiellen Wachstumsphase von *S. aureus* Newman durchgeführt. Aus der Fusion der Milzzellen mit der Myelomzelllinie konnten mehrere Antikörper-produzierende Klone gegen die entsprechenden Antigene selektioniert und kloniert werden. Es fand sich hierunter jedoch nur ein mAk, der sich spezifisch gegen ein Protein aus der SERAM-Gruppe richtete (α -Emp). Aus diesem Grund wurden die folgenden Immunisierungen mit rekombinant hergestellten SERAMs (Coa, vWbp, Efb) durchgeführt.

Die zweite Immunisierung (B) erfolgte mit rekombinant hergestelltem und gereinigtem vWbp, das in nativer Form appliziert wurde. Von allen initial getesteten Klonen waren vier *Immunoblot*-positiv. Während der Expansion blieb jedoch nur einer der Klone in der Antikörper-Produktion stabil und wurde daraufhin subkloniert. In weiteren Tests zur Spezifität des Antikörpers zeigte sich jedoch, dass ein spezifischer Nachweis des von *S. aureus* sezernierten vWbp im SERAM-Gemisch damit nicht möglich war. Neben rekombinantem vWbp reagierte der mAk auch mit den rekombinanten Proteinen Coa und Emp. Es wurde geprüft, ob der mAk gegen ein Epitop gerichtet ist, das allen rekombinanten Proteinen gemeinsam, jedoch im natürlichen vWbp nicht vorhanden ist. Ein Kandidat dafür wäre der Hexahistidyl-Rest ((His)₆-Tag) oder die Faktor Xa-Schnittstelle, die in den rekombinanten Proteinen vorhanden ist.

Die dritte Immunisierung (C) wurde simultan mit den rekombinanten Proteinen Coa, vWbp und Efb durchgeführt. Aus der Fusion konnten monoklonale Antikörper gegen Coa (vgl. 3.2.4.1) und Efb (vgl. 3.2.4.2) generiert werden. Für vWbp blieb der Erfolg bei dieser Fusion aus.

Im Rahmen der vierten Fusion (Immunisierung mit rekombinantem vWbp) war das Ergebnis des initialen *Screenings* ähnlich wie zuvor. Daraus konnte jedoch zumindest ein Klon erfolgreich selektioniert und kloniert werden, der sich in der Folge als spezifisch und in der Antikörper-Produktion stabil erwies (vgl. 3.2.5.1)

4.1.2.1 Unspezifische Reaktionen der monoklonalen Antikörper

Immunoassays wie ELISA und *Western Blot* (*Immunoblot*) basieren auf einer spezifischen Interaktion von Antigen und Antikörper bei möglichst weitgehender Minimierung unspezifischer Reaktionen. *Staphylococcus aureus* sezerniert mit Sbi und Protein A zwei Proteine, die das Fc-Fragment von Immunglobulinen der Klasse G binden (Goding, 1978, Zhang *et al.*, 1998). Ist *S. aureus* selbst Gegenstand der Untersuchung führt diese

Eigenschaft zu einem bekannten Problem: In ELISAs und *Immunoblots* werden die zur Detektion eingesetzten Antikörper nicht nur aufgrund einer spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktion fixiert, sondern auch unspezifisch über das Fc-Fragment durch Protein A gebunden. (Guidry *et al.*, 1991, Nguyen *et al.*, 2010).

Auch bei allen in dieser Arbeit durchgeführten *Immunoblots* mit sezernierten Kulturüberstandsproteinen von *S. aureus* traten neben den erwarteten spezifischen Reaktionen auch ausnahmslos unspezifische Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 40 und 55 kDa auf. Diese könnten auf die beschriebene Interaktion mit IgG-bindenden Proteinen zurückzuführen sein. Ein in diesem Bereich durch MALDI-TOF identifiziertes kationisches Protein könnte ebenfalls zu unspezifischen Wechselwirkungen beitragen (Pambakian und Poston, 1987). Böllner (Dissertation, 2015) konnte durch massenspektrometrische Analyse eine der unspezifisch-reaktiven Proteinbanden einem positiv geladenen Protein (ADC36907.1) zuordnen, das möglicherweise IgG unspezifisch bindet (Böllner, 2015).

Protein A verfügt C-terminal über ein LPETG-Motiv (O'Halloran *et al.*, 2015). Proteine, die eine Signalsequenz dieser Art aufweisen, werden über Sortase A kovalent in der Zellwand verankert (Schneewind und Missiakas, 2012). Trotz dieser Tatsache, lässt sich Protein A neben seiner zellwandassoziierten Lokalisation, auch im bakteriellen Kulturüberstand nachweisen (Movitz, 1976, Becker *et al.*, 2014, O'Halloran *et al.*, 2015). Die Endopeptidase LytM trägt dabei als entscheidender Faktor zur Freisetzung von Protein A aus der Zellwandverankerung bei (Becker *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sich neben dem proteolytisch freigesetzten Protein A auch deren von Sortase A unprozessierte Form im Zellkulturüberstand findet. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der spezifischen Sequenz und Ladung des C-terminalen Endes (O'Halloran *et al.*, 2015).

Da auch in dieser Arbeit Kulturüberstände von *S. aureus* analysiert wurden, war anzunehmen, dass es in *Immunoblots* und weiteren immunologischen Nachweisen zu relevanten Interferenzen kommen kann.

In zahlreichen Arbeiten wurden verschiedenste Lösungsstrategien für dieses Problem vorgeschlagen. Diese sind jedoch alle mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Nguyen *et al.* konnten zeigen, dass in *Assays* zur Detektion und Quantifizierung von LukS-PV die Interaktion von Protein A mit den detektierenden Antikörpern durch Zusatz des Oligopeptids DEPEC effektiv inhibiert werden kann (Nguyen *et al.*, 2010).

Da sich die in dieser Arbeit nachgewiesenen Proteine in ihrem Molekulargewicht deutlich von den unspezifisch gebundenen Proteinen unterschieden, war deren Detektion und Analyse im *Immunoblot* unabhängig von den unspezifischen mAk-Reaktionen möglich. Auf eine Inhibition der unspezifischen mAk-Protein A-Bindung wurde deshalb verzichtet.

Kritisch hingegen ist die Interpretation von Signalen in ELISAs und den in dieser Arbeit durchgeführten immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP). Hier wäre ein kumulatives Signal aus spezifisch und unspezifisch gebundenen Antikörpern zu erwarten. In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass eine Färbung mit dem sekundären Antikörper allein (Ziege α -Maus IgG Cy3) nur ein schwaches IF-Signal ergab. Soweit möglich wurden als weitere Negativkontrollen entsprechende *S. aureus*-Deletionsmutanten (*S. aureus* Newman *coa* und Newman *vwbp emp*) verwendet und diese im selben Ansatz mit dem Wildtyp verglichen. Signaldifferenzen konnten so auf eine spezifische Interaktion des jeweiligen mAks mit dem entsprechenden Antigen zurückgeführt werden. Eine weitere Inhibition unspezifischer Bindungen schien vor diesem Hintergrund nicht nötig.

4.1.2.2 mAk A214C9 (α -Emp)

Der monoklonale Antikörper mAk A214C9 (α -Emp) konnte aus der ersten Fusion (A) mit TCA-gefällten Kulturüberstandsproteinen von *S. aureus* Newman gewonnen werden. Der Klon A214C9 erwies sich in der Produktion der Antikörper stabil. Der Nachweis der Spezifität für das Protein Emp erfolgte durch Vergleich des Bindungsverhaltens sezernierter Proteine von *S. aureus* Newman Wildtyp und der entsprechenden Mutante *S. aureus* Newman *vwbp emp* im *Immunoblot*. Da die entsprechende Bande im Bereich von ca. 38 kDa bei der Mutante (Newman *vwbp emp*) nicht nachweisbar war, konnte angenommen werden, dass das gebundene Antigen mit Emp identisch ist. Zur Erhärtung dieser Hypothese wurde gezeigt, dass mAk A214C9 auch das in dieser Arbeit hergestellte rekombinante Emp bindet, während eine Reaktion mit anderen rekombinanten Proteinen (Coa, vWbp, Efb) ausblieb. Eine nur bei der Emp-Mutante (Newman *vwbp emp*) nachgewiesene Proteinbande einer molekularen Größe von ca. 23 kDa könnte auf einen in dieser noch vorhandenen N-terminalen Abschnitt von Emp zurückzuführen sein.

Die Isotypisierung ergab, dass es sich bei mAk A214C9 um einen Antikörper der Klasse IgG₁ handelt.

Im *Immunoblot* konnten damit noch 0,2 µg des rekombinanten Emp spezifisch nachgewiesen werden (Detektionsgrenze).

4.1.2.3 mAk C202H7 (α -Efb)

Der monoklonale Antikörper C202H7 (α -Efb) wurde aus der Fusion C (Immunisierung simultan mit rekombinantem Coa, vWbp und Efb) gewonnen. Nach der Klonierung zeigte sich Klon C202H7 stabil in der Produktion von Antikörpern gegen rekombinantes Efb. Im *Immunoblot* der Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* Newman konnte damit neben den bekannten unspezifischen Banden ein Protein im Bereich von ca. 15 kDa detektiert werden. Das rekombinante Efb ließ sich hingegen wie erwartet bei ca. 19 kDa nachweisen. Efb von *S. aureus* Newman wurde als 19 kDa-Protein mit einer vorhergesagten molekularen Masse von 15,9 kDa beschrieben (Boden und Flock, 1994). Der Größenunterschied des nachgewiesenen sezernierten Proteins von *S. aureus* Newman im Vergleich zum rekombinanten Protein könnte auf eine partielle Degradation oder/und auf den Hexahistidyl-Rest ((His)₆-Tag) zurückzuführen sein. Abbauprodukte von Efb konnten auch in aufgereinigten Kulturüberstandsproteinen von *S. aureus* Newman (7 h-Kulturen) durch MALDI-TOF-Analyse zwischen 11 und 17 kDa nachgewiesen werden (Herbert *et al.*, 2010). mAk C202H7 bindet im *Immunoblot* rekombinantes Efb. Eine Bindung der rekombinanten Proteine Coa, vWbp und Emp konnte nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für die Efb-Spezifität des mAk.

Die Isotypisierung ergab, dass es sich um einen Antikörper der Klasse IgG_{2b} handelt. Die Detektionsgrenze im *Immunoblot* lag bei 0,05 µg des rekombinanten Efb. mAk C202H7 eignete sich auch zur spezifischen immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von Efb im 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP).

4.1.2.4 mAk C231D3 (α -Coa)

Der monoklonale Antikörper C231D3 (α -Coa) wurde aus Fusion C (Immunisierung simultan mit rekombinantem Coa, vWbp und Efb) gewonnen. Der entsprechende Klon C231D3 erwies sich in der Produktion der Antikörper stabil. Der Test auf Coa-Spezifität erfolgte im *Immunoblot*: Um zu bestätigen, dass die Reaktion mit rekombinanter Coa auf ein spezifisches Epitop dieses Antigens zurückzuführen war, wurden im *Immunoblot* alle rekombinanten Proteine (Coa, vWbp, Emp, Efb) mit Zellkulturüberstand des Klons C231D3 inkubiert. Nur die rekombinante Koagulase konnte in diesem Ansatz detektiert werden, während eine Reaktion mit den übrigen rekombinanten Proteinen (vWbp, Emp,

Efb) ausblieb. Das entsprechende Epitop musste also spezifisch für die rekombinante Coa sein. Damit war jedoch noch nicht nachgewiesen, dass mAk C231D3 auch die von *S. aureus* Newman sezernierte, native Staphylokoagulase bindet. In einem *Immunoblot* der gefällten Überstandproteine von *S. aureus* Newman konnte eine Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von ca. 87 kDa detektiert werden, die im Proteinspektrum der entsprechenden Mutante (Newman *coa*) nicht nachweisbar war. Bei dieser Bande musste es sich also höchstwahrscheinlich um Coa handeln. Die bereits beschriebenen unspezifischen Banden traten bei Wildtyp und Mutante gleichermaßen auf.

Zur weiteren Charakterisierung wurde der Antikörper isotypisiert. Er ließ sich der Klasse IgG_{2b} zuordnen. Die Detektionsgrenze im *Immunoblot* lag bei 0,05 µg der rekombinanten Koagulase (Coa).

Eine immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von Coa in *S. aureus*-Mikrokolonien im 3D-CoG/FP war mit diesem mAk leider nicht möglich. Wahrscheinlich ist das Epitop in der nativen, zellwandassoziierten Coa nicht für den Antikörper zugänglich oder die Coa ist nur in nicht detektierbaren Mengen in der Zellwand vorhanden.

4.1.2.5 mAk C102 (α -Coa)

Bei mAk C102 handelt es sich ebenfalls um einen Coa-spezifischen Antikörper, der aus Fusion C gewonnen werden konnte. Der Nachweis der Spezifität erfolgte wie bei mAk C231D3 (vgl. 4.1.2.4). Im *Immunoblot* zeigten sich im Bindungsverhalten keine Unterschiede zu diesem mAk. Da er jedoch aus einem anderen ursprünglichen Klon generiert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass er auch ein anderes Epitop der Koagulase Coa erkennt. Mit mAk C102 ließ sich im 3D-CoG/FP kein spezifisches IF-Signal detektieren.

4.1.2.6 mAk D35B11 (α -vWbp)

Der monoklonale Antikörper D35B11 konnte aus Fusion D (Immunisierung mit rekombinantem vWbp) gewonnen werden. Nachdem sich der Klon in der Antikörperproduktion stabil erwies, wurde dessen Spezifität für vWbp überprüft. Dazu wurde in einem *Immunoblot* die Reaktion des unverdünnten Zellkulturüberstands mit allen in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteinen getestet. Dabei konnte nur die Bindung an das rekombinante vWbp nachgewiesen werden, während die rekombinanten Proteine Coa, Emp und Efb nicht detektiert wurden. Dies sprach für die vWbp-Spezifität von mAk D35B11. Daraufhin wurde in einem *Immunoblot* überprüft, ob

der mAk auch das von *S. aureus* Newman sezernierte vWbp erkannte. Im Vergleich der sezernierten Proteine von *S. aureus* Newman und der entsprechenden Mutante (*S. aureus* Newman *vwbp emp*) konnte beim Wildtyp eine Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von ca. 66 kDa detektiert werden, die bei der Mutante nicht nachweisbar war. Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass mAk D35B11 zur spezifischen Detektion von vWbp im *Immunoblot* geeignet war. Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers wurde eine Isotypisierung durchgeführt. mAk D35B11 gehört demnach zur Klasse IgG_{2b}. Die Detektionsgrenze im *Immunoblot* lag bei 0,05 µg des rekombinanten vWbp.

4.1.2.7 mAk A198F3 (α -IsaA)

mAk A198F3 wurde aus Fusion A (Immunisierung mit TCA-gefällten Kulturüberstandsproteinen von *S. aureus* Newman) gewonnen. Der Antikörper zeigte eine stabile Reaktion gegen eine Proteinbande einer molekularen Größe von ca. 25 kDa. Unter Zuordnung der Protein-Größenmarker konnte die entsprechende Bande in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) identifiziert und mittels MALDI-TOF analysiert werden. Danach handelte es sich um das *Immunodominant surface antigen A* (IsaA). mAk A198F3 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert.

4.1.2.8 mAk A97D6 (α -Glycerolesterhydrolase/Lipase)

Auch mAk A97D6 konnte aus Fusion A gewonnen werden. Die Identifizierung des Antigens erfolgte wie bei mAk A198F3 bereits beschrieben (vgl. 4.1.2.7). Die Proteinbande konnte mittels MALDI-TOF der Glycerolesterhydrolase/Lipase zugeordnet werden. Da es sich dabei nicht um ein Protein der SERAM-Familie handelt, wurde eine weitere Charakterisierung dieses monoklonalen Antikörpers nicht durchgeführt.

4.1.2.9 Weitere mAks gegen sezernierte Proteine

Da im Rahmen von Fusion A die Immunisierung mit dem gesamten Spektrum an Kulturüberstandsproteinen erfolgte, konnten zahlreiche weitere positive Klone identifiziert werden. Stabile Klone wurden vereinzelt, sodass weitere mAks gegen sezernierte Kulturüberstandsproteine von *S. aureus* generiert werden konnten. Eine genauere Charakterisierung wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.1.3 Anwendung der monoklonalen Antikörper zur Pathotypisierung klinischer *S. aureus*-Isolate

Herbert *et al.* charakterisierten 2010 das Exoproteinprofil von *S. aureus* Newman und weiterer *S. aureus*-Stämme, indem sie die jeweils prominentesten Proteinbanden einer SDS-PAGE der aufgereinigten Kulturüberstandsproteine mittels MALDI-TOF analysierten (Herbert *et al.*, 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen markanten Unterschied zwischen *S. aureus* Newman und allen anderen zum Vergleich herangezogenen Stämmen: Prominente Proteinbanden, die sich mittels MALDI-TOF den beiden pathogenetisch bedeutsamen SERAMs Coa und Efb (inklusive deren Spaltprodukten) zuordnen ließen, konnten nur bei *S. aureus* Newman nachgewiesen werden (Herbert *et al.*, 2010).

Monoklonale Antikörper erlauben den Nachweis kleinster Mengen ihrer jeweiligen Antigene und können damit zu einer genaueren Pathotypisierung verschiedener *S. aureus*-Stämme bezüglich interessierender Pathogenitätsfaktoren herangezogen werden. Nach der Herstellung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper erfolgten Untersuchungen zum Antikörper-basierten Nachweis der SERAM-Proteine bei klinischen *S. aureus*-Isolaten. Böllner (Dissertation, 2015) konnte mehrere der in der vorliegenden Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper bereits zur Charakterisierung des Exoprotein-Profiles (Coa, vWbp, Emp, Efb) von 12 MRSA-Referenzstämmen im *Immunoblot* einsetzen. Zur Aufkonzentrierung der Kulturüberstandsproteine verwendete Böllner ein Silikat-basiertes Kunstharzgranulat (StrataClean Resins, Stratagene), das über Hydroxylgruppen zu einer effektiven Bindung und Anreicherung von Protein führt (Herstellerangaben) (Böllner, 2015). Diese Methode wurde auch von Herbert *et al.* zur Charakterisierung des Kulturüberstandsprotein-Profiles verschiedener *S. aureus*-Stämme angewendet (Herbert *et al.*, 2010). Böllner konnte im *Immunoblot* für keinen der getesteten MRSA-Stämme vWbp (sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase) nachweisen (Böllner, 2015). Ein Nachweis von Coa gelang nur für die MRSA-Stämme WI, DM, ND, SD, KLN und GB in der stationären Phase. Für die Proteine Emp und Efb waren bei den meisten der getesteten MRSA-Stämme sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase spezifische Proteinbanden nachweisbar (Böllner, 2015). In Bezug auf Coa und vWbp ging Böllner davon aus, dass möglicherweise die Menge an sezerniertem Protein für eine Detektion nicht ausreichend sei. Eine Erklärung dafür könne sein, dass ein Großteil der

Proteine noch über nicht-kovalente Bindungen mit der Zellwand der Staphylokokken assoziiert ist und damit nicht in den Kulturüberstand gelangt (Böllner, 2015).

Andererseits könnte es bei Aufreinigung mittels „StrataClean Resins“ durch Einflussfaktoren wie pH und Größe und Ladung der aufkonzentrierten Proteine zu einem Proteinverlust kommen (quantitatives Problem).

Eine etablierte Methode, die unabhängig von derartigen Faktoren zu einer Konzentrierung aller in einer Probe vorhandenen Proteine führt, ist die Präzipitation mittels Trichloressigsäure (TCA-Fällung). Um auszuschließen, dass die Ergebnisse von Böllner (Dissertation, 2015) methodisch bedingt waren, wurden die *Immunoblots* zum Nachweis der Proteine Coa, vWbp, Emp und Efb unter Anwendung der TCA-Fällung durchgeführt. Im Gegensatz zu Böllner (Dissertation, 2015) wurde zur Kultivierung der Stämme nicht LB-, sondern RPMI-Medium (Wirts-adaptiert, Zellkulturmedium hier auch im 3D-CoG/FP verwendet) verwendet. Neben den MRSA-Stämmen wurden in dieser Arbeit weitere klinische MSSA- und MRSA-Isolate bzgl. ihres Expressionsverhaltens in Flüssigkultur und im 3D-CoG/FP untersucht.

Darüber hinaus wurde die von Böllner (Dissertation, 2015) als mögliche Erklärung angeführte Hypothese überprüft, ob ein Teil des Proteins über nicht-kovalente Bindungen mit der Zellwand der Bakterien assoziiert sein könnte. Dazu wurden die zellwandassoziierten Proteine aus den Zellsedimenten der entsprechenden RPMI-Kulturen nach einem modifizierten Protokoll von Hussain *et al.* extrahiert (Hussain *et al.*, 2002) (vgl. 2.16.5) und im *Immunoblot* auf Anwesenheit der entsprechenden Proteine (Coa, vWbp, Emp, Efb) untersucht. Hierbei konnte in nahezu allen Fällen keine oder nur minimale Mengen der entsprechenden Proteine detektiert werden (genauere Darstellung in den Diskussionsteilen der entsprechenden SERAMs: 4.1.3.3, 4.1.3.4, 4.1.3.5 und 4.1.3.6).

4.1.3.1 Wachstumsverhalten klinischer MRSA- und MSSA-Isolate im 3D-CoG/FP

Vor der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse der klinischen MRSA- und MSSA-Isolate im 3D-CoG/FP wurde deren Wachstumsverhalten hinsichtlich der Ausbildung der von Guggenberger *et al.* beschriebenen Strukturen der Mikrokolonien (Pseudokapsel (Coa-abhängig) und MAM (vWbp-abhängig)) untersucht (Guggenberger *et al.*, 2012). Eine Pseudokapsel war bei allen Stämmen bis auf MRSA WU2 nachweisbar. Das *Microcolony-associated Meshwork* (MAM) konnte nur bei den Stämmen MRSA SP2 und MSSA BK4/2 und WU2/2 nachgewiesen werden.

4.1.3.2 Detektion bakterieller Zellwandbestandteile mittels FITC-Lektin

FITC-Lektin eignet sich zur Detektion von Bestandteilen der bakteriellen Zellwand (N-Acetyl- β -D-glucosamin-Reste und N-Acetyl- β -D-glucosamin-Oligomere). Die fluoreszenzmikroskopischen Färbungen in dieser Arbeit zeigten aber deutliche Unterschiede in der Anfärbbarkeit verschiedener *S. aureus*-Stämme mittels FITC-Lektin (vgl. Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3). Insbesondere bei relativ größeren ($> 50 \mu\text{m}$) und „dicht gepackten“ Mikrokolonien (MSSA SP1/2, MSSA SP2/2, MRSA WU2) waren teilweise besonders schwache FITC-IF-Signale zu detektieren. Relativ kleinere Kolonien ($< 25 \mu\text{m}$) oder visuell weniger „dicht gepackte“ Mikrokolonien (MRSA SP2, MSSA BK4/2, MRSA WU1 und MSSA WU1/2) ließen sich hingegen besonders gut mittels FITC-Lektin anfärben. Möglicherweise ist also die Zugänglichkeit der Zielstrukturen für FITC-Lektin von der Morphologie und Größe der Mikrokolonien abhängig. Böllner (Dissertation, 2015) konnte jedoch mit FITC-konjugiertem polyvalentem Kaninchenantiserum gegen *S. aureus*-Bakterien (Anti-Sau) *S. aureus*-Mikrokolonien unabhängig von Größe und Kompaktheit komplett anfärben (Böllner, 2015). Denkbar wäre auch, dass Modifikationen des Peptidoglykans wie z. B. die O-Acetylierung der N-Acetylmuraminsäure (Bera *et al.*, 2005) oder eine Maskierung durch die zahlreichen zellwandassoziierten Proteine (Kim *et al.*, 2018) zu Unterschieden in der Anfärbbarkeit der entsprechenden Strukturen führen.

4.1.3.3 Coa: Nachweis mittels mAk C231D3 (α -Coa)

Die Staphylokoagulase (Coa) gehört zu den prominentesten Exoproteinen von *S. aureus*. Als extrazellulärer Virulenzfaktor vermittelt sie die Koagulation von Plasma (Hendrix *et al.*, 1983, Kawabata *et al.*, 1985) und ist Grundlage der Einteilung von Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Spezies (Becker *et al.*, 2014). Bereits 1934 wurde der Zusammenhang von Pathogenität und koagulatorischer Aktivität bei Staphylokokken beschrieben (Chapman *et al.*, 1934). Mit der Kristallstrukturanalyse von Coa konnte 2003 dann auch der molekulare Mechanismus ihrer prokoagulatorischen Aktivität aufgeklärt werden: Die spezifische Interaktion von Coa mit Prothrombin führt über eine allosterische Konformationsänderung zu dessen nicht-proteolytischer Aktivierung (Friedrich *et al.*, 2003). Zahlreiche Untersuchungen weisen auf die Schlüsselrolle von Coa im Infektionsgeschehen von *S. aureus* hin (Cheng *et al.*, 2010, Cheng *et al.*, 2011, McAdow *et al.*, 2011, Panizzi *et al.*, 2011). Im mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) vermittelt Coa die Bildung

einer der *S. aureus*-Mikrokolonie eng anliegenden Fibrinstruktur, der Pseudokapsel (Guggenberger *et al.*, 2012). Der für Analysen und Pathogenitätsstudien vielfach verwendete Stamm *S. aureus* Newman hyperproduziert aufgrund einer Mutation in der Sensordomäne des SaePQRS-Systems eine im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen erhöhte Menge entsprechender SERAMs. Dazu gehört auch die Staphylokoagulase (Coa) (Schafer *et al.*, 2009, Mainiero *et al.*, 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde als Ausgangs- und Referenzstamm *S. aureus* Newman verwendet. Mit dem generierten monoklonalen Antikörper C231D3 (α -Coa) konnte bei *S. aureus* Newman Coa spezifisch im Kulturüberstand der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6$) detektiert werden. In der stationären Phase (16 h) war eine Detektion jedoch nicht mehr möglich. Dass Coa von *S. aureus* Newman bereits in der exponentiellen Phase (2,5 h-Kultur) in größeren Mengen produziert und in den Überstand sezerniert wird, konnten mittels MALDI-TOF-Analyse bereits Herbert *et al.* zeigen (Herbert *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, ob sich noch relevante Mengen Koagulase (Coa) in den Zellsedimenten von *S. aureus* Newman finden. Dies war weder in der exponentiellen, noch in der stationären Phase der Fall, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der größte Teil von Staphylokoagulase (Coa) tatsächlich in die Umgebung sezerniert wird und nicht mehr mit der Zellwand von *S. aureus* Newman assoziiert ist.

Die Detektion von Coa im *Immunoblot* gelang jedoch für keinen der getesteten MRSA-Referenzstämme und klinischen MRSA- und MSSA-Isolate (weder in der stationären noch in der exponentiellen Phase). Böllner konnte zumindest für einige der MRSA-Referenzstämme geringe Mengen Coa in der stationären Phase nachweisen (Böllner, 2015). Dazu wurde jedoch ein anderer Ak verwendet, der aufgrund der Instabilität des entsprechenden Klons in der vorliegenden Arbeit nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Möglicherweise sind also auch die mittels TCA-Fällung aufgereinigten Proteinmengen zu gering, um mittels mAk C231D3 im *Immunoblot* detektiert zu werden. Die von Böllner angeführte Erklärung, dass sich noch größere Mengen der nachzuweisenden Proteine im Zellsediment in loser Assoziation zur Zellwand finden könnten, konnte durch meine Analyse der extrahierten zellwandassoziierten Proteine ausgeschlossen werden. In den entsprechenden *Immunoblots* war Coa nicht detektierbar (vgl. Abbildung 3.36 und Abbildung 3.38).

Da von Coa eine hohe Variabilität bekannt ist, könnte mAk C231D3 spezifisch für ein Epitop von *S. aureus* Newman sein. Watanabe *et al.* untersuchten 2005 den genetischen Hintergrund und die Struktur 10 bekannter Koagulase-Serotypen. Neben hoch-

konservierten Domänen fanden sie auch Bereiche in denen die durchschnittliche Aminosäure-Übereinstimmung nur 52,8% betrug (D2-Region) (Watanabe *et al.*, 2005). 2009 erfolgte auf Basis des Vergleichs der Nucleotidsequenzen von 105 *coa*-Genen die Einteilung der Prothrombin-aktivierenden D1-Region in 12 *Cluster* (jeweils mehr als 90 % Übereinstimmung) (Watanabe *et al.*, 2009). Die Staphylokoagulase von *S. aureus* Newman ist dem Typ IIIa zuzuordnen (Watanabe *et al.*, 2009).

Der fehlende Nachweis von Coa im *Immunoblot* könnte auch auf eine Degradation durch extrazelluläre Proteasen von *S. aureus* zurückzuführen sein. Als bedeutende Virulenzfaktoren tragen Proteasen in vielfältiger Weise zur Krankheitsprogression *S. aureus*-bedingter Infektionen bei (Shaw *et al.*, 2004). Dabei spielt der Abbau von Proteinen des Wirtes eine große Rolle (Potempa *et al.*, 1986, Massimi *et al.*, 2002, Imamura *et al.*, 2005). Die von *S. aureus* sezernierten Protease scheinen aber auch eigene Virulenzfaktoren nicht vor Degradation zu schonen. Böllner (2015) wies bereits darauf hin, dass dies für die zellwandgebundenen Fibronektin-Bindeproteine (FnBPs), den *Clumping Factor B* (ClfB) sowie Protein A gezeigt wurde (McGavin *et al.*, 1997, Karlsson *et al.*, 2001, McAleese *et al.*, 2001). 2013 konnten Kolar *et al.* zeigen, dass die Deletion von 10 Exo-Proteasen zu einer erhöhten Stabilität zahlreicher zellwandgebundener und sezernierter Faktoren führte (Kolar *et al.*, 2013). Auch für die Staphylokoagulase konnte dabei im Rahmen einer massenspektrometrischen Analyse ein 2-facher Anstieg beobachtet werden (Kolar *et al.*, 2013). Eine zumindest partielle Degradation von Coa durch extrazelluläre Proteasen könnte auch beim Nachweis von Coa im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Rolle gespielt haben. Allerdings wären in diesem Fall bei einer ausreichenden Menge zumindest noch Degradationsfragmente im *Immunoblot* zu erwarten gewesen.

Im 3D-CoG/FP konnte Coa mit mAk C231D3 nicht detektiert werden. Leider erwiesen sich auch weitere in der Arbeit generierte Coa-Antikörper (C102) nicht zur immunfluoreszenzmikroskopischen Anwendung geeignet. Guggenberger konnte mittels polyklonalem α -Coa Kaninichenserum im 3D-CoG/F Coa nach 16 h in Kolo-kalisation zur Pseudokapsel nachweisen (Guggenberger *et al.*, 2012). Damit konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass das negative Immunfluoreszenzergebnis mit mAk C231D3 (α -Coa) auf eine Degradation von Coa in der stationären Phase (16 h) zurückzuführen war. Wie von Böllner (Dissertation, 2015) bereits angemerkt, ist es nicht ungewöhnlich, dass Antikörper im *Immunoblot* ein positives Signal ergeben, während sie für die immunfluoreszenzmikroskopische Detektion nicht geeignet sind. Im *Immunoblot* liegen

die Antigene überwiegend in denaturierter Form vor. Im PFA-fixierten 3D-CoG/FP könnte das entsprechende Epitop in nativer Konformation maskiert sein, sodass es von dem *Immunoblot*-positiven mAk nicht gebunden werden kann. Da der größte Teil der im 3D-CoG/FP analysierten Stämme eine Pseudokapsel (durch Coa vermittelt) ausbildet, kann davon ausgegangen werden, dass Coa in dafür ausreichender Menge transkribiert und sezerniert wird.

4.1.3.4 vWbp (mAk D35B11, α -vWbp)

Wie die Staphylokoagulase (Coa) gehört auch das von Willebrand-Faktor Bindeprotein (vWbp) zu einer Gruppe bifunktioneller Proteine, die als ZAAPs (*zymogen activator and adhesion proteins*) bezeichnet werden. N-terminale Domänen aktivieren dabei auf nicht-proteolytische Weise Zymogene, während C-terminale Abschnitte von Coa und vWbp die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix vermitteln (Panizzi *et al.*, 2004). Als Koagulase vermittelt vWbp die Bildung eines distal um die *S. aureus*-Mikrokolonie lokalisierten Fibrinnetzwerks, das *Microcolony associated Meshwork* (MAM). Dies konnte Guggenberger in einem mit Fibrinogen supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/F) zeigen (Guggenberger *et al.*, 2012). Im Rahmen der Analyse des Exoproteinprofils von *S. aureus* wurden auch Expression und Sekretion von vWbp bei verschiedenen klinischen *S. aureus*-Isolaten untersucht. Böllner (Dissertation, 2015) untersuchte mit mAk D35B11 (α -vWbp) bereits MRSA-Referenzstämme im *Immunoblot* hinsichtlich der Expression von vWbp. Bei keinem der Stämme war vWbp in den aufkonzentrierten Kulturüberstandsproteinen nachweisbar, sodass Böllner davon ausging, dass ein größerer Teil der Proteine noch mit der Zellwand von *S. aureus* assoziiert ist und damit im Zellsediment vorliegt (Böllner, 2015). Um diese Vermutung zu überprüfen wurden in der vorliegenden Arbeit neben den TCA-gefällten Kulturüberstandsproteinen auch die entsprechenden Zellsedimente (extrahierte Zellwandproteine) im *Immunoblot* auf Vorhandensein von vWbp untersucht. Neben den bereits von Böllner (Dissertation, 2015) getesteten MRSA-Referenzstämmen wurden darüber hinaus weitere klinische MSSA- und MRSA-Isolate getestet. Wie bei Böllner (Dissertation, 2015) war vWbp bei *S. aureus* Newman deutlich in der exponentiellen Phase nachweisbar (Kulturüberstandsproteine). In der stationären Phase waren nur noch geringe Mengen (schwache Proteinbande) detektierbar. In den Zellwandextrakten war bei *S. aureus* Newman das vWbp weder in der exponentiellen noch in der stationären Phase nachweisbar. Im Gegensatz zu den von Böllner (Dissertation, 2015) untersuchten

Stämmen konnten geringe Mengen vWbp bei den MRSA-Stämmen WI und KG im bakteriellen Kulturüberstand der exponentiellen Phase sowie für MRSA KG im Kulturüberstand der stationären Phase nachgewiesen werden. Alle weiteren Kulturüberstände der untersuchten MRSA-Referenzstämme sowie der klinische MSSA- und MRSA-Isolate waren *Immunoblot*-negativ. Wie für Coa kommen auch für vWbp für den fehlenden bzw. schwachen Nachweis im *Immunoblot* verschiedene Erklärungen in Betracht: Insbesondere vor dem Hintergrund, dass *S. aureus* Newman aufgrund einer Mutation zahlreiche Proteine, die durch das SaePQRS-System reguliert werden hyperproduziert, könnte es sein, dass die von den entsprechenden Wildtypen produzierten Mengen nicht für eine Detektion im *Immunoblot* ausreichen.

Für Coa wurde bereits ausführlich auf die Möglichkeit der Degradation durch von *S. aureus* produzierte extrazelluläre Proteasen hingewiesen (Kolar *et al.*, 2013). Da zahlreiche zellwandassoziierte und sezernierte Proteine von dieser Degradation betroffen sind, wäre denkbar, dass auch vWbp durch einen dadurch bedingten Abbau im *Immunoblot* nicht mehr nachweisbar ist.

Watanabe *et al.* (2005) fanden, dass das *vWbp*-Gen bei drei (NCTC 8325, MW2; MRSA 252-2) von sieben untersuchten *S. aureus*-Stämmen verkürzt war. Unter Vergleich der *vWbp*-Gene von vier weiteren Stämmen konnten zwei Allele identifiziert werden, deren Aminosäuresequenz (AS)-Ähnlichkeit nur 70,9 % betrug (*S. aureus* N315 und *S. aureus* COL) (Watanabe *et al.*, 2005). Wie bei Coa waren die AS-Übereinstimmungen in den Regionen D1 und D2 mit 56,9 % und 53,9 % am geringsten. Möglicherweise ist mAk D35B11 (α -vWbp) spezifisch für ein Epitop in dieser variablen Region. Unter der Voraussetzung, dass es weitere Varianten des *vwbp*-Gens gibt, wäre denkbar, dass mAk D35B11 das stammspezifische Epitop des vWbp von *S. aureus* Newman bindet.

mAk D35B11 (α -vWbp) war nicht zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von vWbp im 3D-CoG/FP geeignet. Die IF-Signale von *S. aureus* Newman und der Mutante *S. aureus* Newman *vwbp emp* unterschieden sich nicht. Zu möglichen Erklärungen dafür sei auf die Ausführungen zu mAk C231D3 (α -Coa) verwiesen (vgl. 4.1.3.3).

4.1.3.5 Emp (mAk A214C9, α -Emp)

Das 38,5 kDa große Extrazelluläre Matrix-Bindeprotein (Emp) weist nicht das für eine kovalente Zellwandverankerung typische LPXTG-Motiv auf und ist deshalb den sezernierbaren extrazellulären Proteinen (SERAMs) zuzuordnen (Chavakis *et al.*, 2005).

Als Adhäsine ist es in der Lage Proteine der extrazellulären Matrix des Wirtes zu binden. Dazu gehören Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronektin (Hussain *et al.*, 2001a). Emp spielt eine Schlüsselrolle in der Bildung von *S. aureus*-Biofilmen. Die Mutante *S. aureus* Newman *vwbp emp* weist im Vergleich zum Wildtyp eine 90-prozentige Reduktion der Biofilmbildung auf (Johnson *et al.*, 2008). Die Expression von *emp* wird dabei durch Eisenmangelbedingungen induziert, während hohe Konzentrationen an $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ eine deutliche Reduktion des Emp-Expressionslevels zur Folge haben (Johnson *et al.*, 2008). Dies ist wahrscheinlich eine Anpassung an die Eisenrestriktion unter *in vivo*-Bedingungen (Johnson *et al.*, 2008). Die Erstbeschreiber des Proteins (Hussain *et al.*, 2001) zeigten, dass das Adhäsine vor allem in der spät-exponentiellen/stationären Wachstumsphase exprimiert wird. In der selben Arbeit konnte Emp vorwiegend in SDS-extrahierten Oberflächenproteinen des Zellsediments nachgewiesen werden, während im 40-fach konzentrierten Überstand Emp nur in geringsten Mengen detektierbar war (Hussain *et al.*, 2001a). Mittels polyklonalem α -Emp-Kaninchenserum konnte Guggenberger im 3D-CoG/F Emp im Bereich der Pseudokapsel (einer der Staphylokokken-Mikrokolonie eng anliegenden Fibrin-Struktur) immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Guggenberger *et al.*, 2012).

Mit dem monoklonalen Antikörper A214C9 (α -Emp) gelang die Etablierung und Charakterisierung eines Antikörpers, der sich zur spezifischen Detektion von Emp sowohl im *Immunoblot* als auch in der immunfluoreszenzmikroskopischen Anwendung (3D-CoG/FP) als geeignet erwies. In TCA-gefällten Kulturüberstandsproteinen von *S. aureus* Newman war Emp damit deutlich in der exponentiellen ($\text{OD}_{600} = 0,6$) sowie in der stationären Phase (16 h Übernachtskultur) nachweisbar. In der stationären Phase waren neben der Hauptbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 38 kDa noch kleinere/schwächere Banden detektierbar, die in der exponentiellen Phase nicht nachweisbar waren. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in dieser Phase partiell degradiert wurde, möglicherweise aufgrund der bereits erwähnten extrazellulären Proteasen (Kolar *et al.*, 2013). Emp war auch in der Fraktion der extrahierten zellwandassoziierten Proteine (SDS-extrahiert) in beiden Wachstumsphasen deutlich nachweisbar. Dies bestätigt die Ergebnisse von Hussain *et al.* (2001), die einen großen Anteil des sezernierten Emp zellwandassoziiert lokalisierten (Hussain *et al.*, 2001a). Während Hussain *et al.* in 40-fach konzentrierten Zellkulturüberständen nur minimale Spuren an Emp nachweisen konnten, waren in der vorliegenden Arbeit die Mengen an detektiertem Emp in durch TCA-Fällung aufkonzentrierten Kulturüberstandsproteinen

vergleichbar mit den aus den Zellsedimenten extrahierten Mengen. Dies deutet darauf hin, dass Emp seine Wirkung möglicherweise sowohl in der oberflächenassoziierten, als auch in der sezernierten Form entfalten kann.

Die Ergebnisse bzgl. *S. aureus* Newman und den MRSA-Referenzstämmen deckten sich weitgehend (bis auf wenige Stämme) mit den *Immunoblot*-Resultaten von Böllner (Dissertation, 2015), die Kulturüberstandsproteine mittels Kunstharzkügelchen („StrataClean Resin“, Stratagene) aufreinigte (Böllner, 2015). Emp war bei den meisten MRSA-Referenzstämmen sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase (16 h Übernackkultur) nachweisbar, jedoch jeweils in deutlich geringerer Menge als beim Referenzstamm *S. aureus* Newman (vgl. Tabelle 3.4). Auch in den jeweiligen Zellsedimenten (SDS-extrahierte Oberflächenproteine) war Emp größtenteils noch nachweisbar (vgl. Tabelle 3.4).

mAk A214C9 (α -Emp) erwies sich auch zur immunfluoreszenzmikroskopischen (IF-CLSM) Detektion von Emp im 3D-CoG/FP als geeignet. Im 3D-CoG/FP (16 h) ließ sich Emp im Bereich der Pseudokapsel (Randbereich der Kolonie) um die Mikrokolonie lokalisieren, jedoch nicht in der Mikrokolonie selbst. Dies konnte bereits Guggenberger mittels polyklonalem α -Emp-Kaninchenserum zeigen (Guggenberger *et al.*, 2012). Um auszuschließen, dass es sich im ersten Fall um ein Artefakt aufgrund einer Penetrationsbarriere für Antikörper handelte, untersuchte Böllner (Dissertation, 2015) die Anfärbbarkeit der *S. aureus*-Mikrokolonien im 3D-CoG/F mittels *S. aureus*-spezifischen Anti-Sau-Antikörpern. *S. aureus* Newman-Mikrokolonien ließen sich damit komplett anfärben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass unterschiedliche IF-Anfärbemuster nicht Resultat einer mangelnden Penetration des Antikörpers ins Zentrum der Mikrokolonie ist (Böllner, 2015). Geht man davon aus, dass mit dem 3D-CoG/FP bestimmte Teilaspekte der wesentlich komplexeren *in vivo*-Abszessbildung durch Staphylokokken analysiert werden können, ist die Frage von Interesse, wo und ob sich Emp auch in Gewebeabszessen immunhistochemisch nachweisen lässt. Dies ist insofern von Bedeutung, als Emp eine wichtige Rolle in der Formation von *S. aureus*-Nierenabszessen im Maus-Infektionsmodell zukommt (Cheng *et al.*, 2009). Cheng *et al.* konnten Emp in renalen Maus-Abszessen immunhistochemisch im Bereich der innersten Ansammlung von Bakterien, der *Staphylococcal Abscess Community* (SAC) nachweisen. Diese ist von einer Pseudokapsel umgeben, in der sich ein weiteres an der Abszessformation beteiligtes Protein nachweisen ließ, das Extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap) (Cheng *et al.*, 2009). Dies macht deutlich, dass

Lokalisationsanalysen unter den Modellbedingungen des 3D-CoG nicht auf die deutlich komplexere Architektur eines *in vivo*-Abszesses übertragen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden die bereits im *Immunoblot* untersuchten klinischen MSSA- und MRSA-Isolate (vgl. Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) auch im 3D-CoG/FP nach 16 h auf ihre Produktion von Emp hin getestet. Im Vergleich zum Referenzstamm *S. aureus* Newman zeigten sich deutliche Unterschiede bzgl. Produktion und Lokalisation. Bei den meisten der untersuchten Stämme war Emp jedoch weder im *Immunoblot* noch in im 3D-CoG/FP mittels IF-CLSM detektierbar. Auffällig war, dass sich vor allem bei Stämmen die sehr kleine Kolonien (bis ca. 30 µm) bildeten, deutlich sichtbare IF-Signale für Emp detektieren ließen (MRSA SP2, BK2, WU1 sowie MSSA BK4/2). Die IF-Signale waren in diesem Fall jeweils homogen über die Kolonie verteilt und nicht wie bei *S. aureus* Newman nur im Bereich der Pseudokapsel lokalisiert. Eine *S. aureus* Newman-ähnliche Pseudokapsel war jedoch bei allen Emp-positiven Kolonien nachweisbar. Möglicherweise unterscheiden sich die deutlich kleineren und lockerer gepackten Kolonien in ihrer Stoffwechselaktivität und in der Pseudokapselproduktion von Kolonien die deutlich größer sind und eine kompaktere Struktur aufweisen. Bei allen übrigen Stämmen konnten keine eindeutigen IF-Signale detektiert werden. Ein Vergleich der Ergebnisse der Emp-*Immunoblots* mit den IF-Signalen (vgl. Tabelle 3.4, bis auf MRSA SP2 (IF positiv, *Immunoblot*-negativ stimmen diese überein)), deutet darauf hin, dass die Produktion von Emp unter den Bedingungen der Flüssigkultur (RPMI-Medium) mit der Expression in der Umgebung des 3D-CoG/FP korreliert.

4.1.3.6 Efb (mAk C202H7, α -Efb)

Mit nur 19 kDa ist das Extrazelluläre Fibrinogen-Bindeprotein (Efb) ein molekulares „Leichtgewicht“ unter den SERAMs. Durch seine Multifunktionalität erweist sich Efb in seiner Wirkungsweise als einzigartig und in seiner Rolle als Virulenzfaktor im Infektionsgeschehen als zentral. Die N-terminale Domäne (Efb-N) des Proteins vermittelt die Bindung an Fibrinogen (Ko *et al.*, 2011), während C-terminal (Efb-C) ein Bereich lokalisiert ist, der eine spezifische Interaktion mit dem Komplementfaktor C3 ermöglicht (Lee *et al.*, 2004b). Efb verzögert den Heilungsverlauf von Wundinfektionen, trägt zur Persistenz von *S. aureus* im Wirtsgewebe bei und fördert das Überleben der Bakterien in der Lunge während einer Staphylokokken-Pneumonie (Palma *et al.*, 1996, Jongerius *et al.*, 2012). Ergebnisse zu protektiven Immunisierungen weisen Efb als vielversprechenden Kandidaten für eine zukünftige Impfung gegen *S. aureus* aus

(Schennings *et al.*, 2012). Lee *et al.* zeigten 2004, dass Efb aufgrund der inhibitorischen Aktivität auf die C3b-vermittelte Komplementaktivierung eine verminderte opsonophagozytäre Elimination von *S. aureus* zur Folge hat (Lee *et al.*, 2004a). 2013 führten Ko *et al.* die Efb-vermittelte Inhibition der Phagozytose auf einen funktionellen Synergismus der Fibrinogen- und der Komplement-Bindedomänen (Efb-N und Efb-C) zurück (Ko *et al.*, 2013). In ihrer Arbeit konnten sie zeigen, dass Efb zu einer Rekrutierung von Fibrinogen an die bakterielle Zelloberfläche führt. Durch die gleichzeitige Assoziation mit dem auf der Zelloberfläche befindlichen Opsonin C3b kommt es zur Bildung eines multimolekularen Fibrinogen-Schutzschildes, das nicht nur die Bildung von weiterem C3b blockiert, sondern auch die Zugänglichkeit von *S. aureus*-spezifischem IgG inhibiert und damit die Phagozytose erschwert (Ko *et al.*, 2013). Da die Produktion von Efb wie die der Staphylokoagulase (Coa) durch das Regulatorsystem SaePQRS gesteuert wird (Mainiero *et al.*, 2010) und Fibrinogen das Substrat des von Coa aktivierten Prothrombins ist (Friedrich *et al.*, 2003), erscheint es plausibel, dass Coa und Efb in der Pathogenese synergistisch wirken (Ko *et al.*, 2013).

Mit dem in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper C202H7 (α -Efb) konnten neben den bereits von Böllner (Dissertation, 2015) im *Immunoblot* charakterisierten MRSA-Referenzstämmen weitere klinische MSSA- und MRSA-Isolate hinsichtlich ihrer Efb-Expression in RPMI-Flüssigkultur sowie im 3D-CoG/FP charakterisiert werden. Efb war im *Immunoblot* beim überwiegenden Teil der Stämme (Flüssigkultur) sowohl in der exponentiellen als auch in stationären Phase (TCA-gefällte Kulturüberstandspoteine) nachweisbar (vgl. Tabelle 3.5). Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den von Böllner ausgeführten *Immunoblot*-Analysen (Böllner, 2015). Auch bei den in gleicher Weise analysierten klinischen *S. aureus*-Isolaten (MSSA und MRSA) ergab sich ein ähnliches Bild: Bei der Mehrheit der Stämme war Efb sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase nachweisbar (RPMI-Flüssigkultur). Bei einigen Stämmen war Efb nur in der exponentiellen (MSSA SP1/2, MRSA BK1) oder in der stationären (MSSA SP2/2, BK3/2, WU4/2) Phase nachweisbar. Bei allen anderen Stämmen war Efb entweder in beiden Wachstumsphasen oder überhaupt nicht detektierbar (vgl. Tabelle 3.5). Die Analyse der aus den jeweiligen Zellsedimenten extrahierten Oberflächenproteine ergab, dass Efb – im Gegensatz zu Emp – in dieser Fraktion nicht detektierbar war. Die einzige Ausnahme bildete *S. aureus* Newman, bei dem auch in der extrahierten Oberflächenproteinfraktion noch minimale Mengen Efb nachweisbar waren. Dies könnte den Schluss nahelegen, dass Efb seine Wirkung hauptsächlich als

sezernierter Faktor in der Peripherie von *S. aureus* ausübt. Sollte Efb aber ausschließlich in nicht-zellwandassoziiierter Form wirken, wäre nicht zu erklären, wie es die Adhärenz und Persistenz von *S. aureus* im Wirtsgewebe fördern soll. Ko *et al.* zeigten, dass die Assoziation von Efb mit der bakteriellen Zelloberfläche durch die Interaktion von Efb-C mit dem opsonisierenden Komplementfaktor C3b vermittelt wird (Ko *et al.*, 2013). Da die Bakterien *in vitro* nicht dem Komplementsystem ausgesetzt sind, sind Lokalisationsanalysen im 3D-CoG möglicherweise nicht mit der Lokalisation *in vivo* vergleichbar. Im 3D-CoG/FP ließ sich Efb bei *S. aureus* Newman im Bereich der Pseudokapsel lokalisieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Guggenberger (Guggenberger *et al.*, 2012). Mittels polyklonalem α -Coa-Kaninchenserum konnten sie zeigen, dass auch Coa im Bereich der Pseudokapsel (im 3D-CoG/F) lokalisiert ist (Guggenberger *et al.*, 2012). Diese Kolo-kalisation von Coa und Efb unterstützt die Hypothese von Ko *et al.* (2013), dass diese zwei SERAMs (Coa und Efb) funktionell zusammenwirken und wahrscheinlich voneinander abhängig sind (Ko *et al.*, 2013). Die immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von Efb bei den klinischen MSSA- und MRSA-Isolaten im 3D-CoG/FP ergab im Vergleich zum Signal von *S. aureus* Newman eher diskrete Signale. Wie bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von Emp, ließen sich auch beim Nachweis von Efb die stärksten Signale bei den kleineren Kolonien ($\leq 30 \mu\text{m}$, MSSA BK4/2 und MRSA WU1) detektieren. Die IF-Signale ließen sich nicht bei allen untersuchten Stämmen – wie bei *S. aureus* Newman – der Pseudokapsel zuordnen. Teilweise waren sie auch homogen über die gesamte Kolonie verteilt (vgl. Tabelle 3.5), was eine Pseudokapselbildung von kleineren *S. aureus*-Aggregaten in den Mikrokolonien nicht ausschließt.

5 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus sezerniert zahlreiche Virulenz-assoziierte Proteine, die als *Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules* (SERAMs) bezeichnet werden. Klinische *S. aureus*-Isolate unterscheiden sich hinsichtlich ihres SERAM-Repertoires und Musters. Proteine aus der SERAM-Gruppe tragen als multifunktionelle Virulenzfaktoren maßgeblich zur Pathogenese Staphylokokken-bedingter Infektionen bei (Chavakis *et al.*, 2005). *In vivo* vermitteln sie die Interaktion von *S. aureus* mit einer komplexen Gewebematrix und fördern so dessen Dissemination und Infiltration im Wirtsgewebe (Chavakis *et al.*, 2005). Die prokoagulatorische Aktivität der Koagulasen Coa und vWbp führt über die Bildung spezifischer Fibrin-Strukturen zu einer „mechanischen“ Barriere für Zellen des angeborenen Immunsystems (Guggenberger *et al.*, 2012). In Kombination mit zahlreichen weiteren Virulenzfaktoren ermöglichen sie *S. aureus* die Ausbildung der für ihn typischen Haut- und Weichgewebsläsionen.

Mit dem 3D-Kollagengel (3D-CoG) steht ein Modell zur Verfügung, in dem Teilaspekte dieses Prozesses *in vitro* simuliert werden können. Unter Supplementation verschiedener Faktoren (z. B. Fibrinogen, Prothrombin) lässt sich die Umgebung darin beliebig modifizieren und das Wachstum von *S. aureus* in Abhängigkeit davon analysieren (Guggenberger *et al.*, 2012). Guggenberger konnte zeigen, dass bestimmte Morphotypen und Strukturen der *S. aureus*-Mikrokolonien mit der Anwesenheit bestimmter SERAM-Proteine assoziiert sind. Mit polyklonalen Antikörpern gelang in diesem Modell bereits eine Detektion und Lokalisation der Proteine Coa, Emp und Eap (Guggenberger *et al.*, 2012)

Die große Bedeutung sezernierter *S. aureus*-Proteine im Prozess der Pathogenese sowie das zunehmende Interesse an Virulenzfaktoren als protektive oder therapeutische Zielstrukturen, rechtfertigt eine genauere Analyse der Produktion, Sekretion und Lokalisation des SERAM-Musters. Dazu wurden in dieser Arbeit murine monoklonale Antikörper gegen die SERAMs Coa, vWbp, Emp und Efb hergestellt, charakterisiert und an zahlreichen klinischen *S. aureus*-Isolaten hinsichtlich Produktion im Kulturmedium und im mit Fibrinogen und Prothrombin supplementierten 3D-Kollagengel (3D-CoG/FP) erprobt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden dazu die interessierenden Antigene hergestellt (rekombinant und aus Kulturüberstand isoliert). Die Gene der SERAMs Coa, vWbp, Emp

und Efb wurden in *E. coli* kloniert, produziert, gereinigt und zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet. Darüber hinaus wurden auch SERAM-Gemische aus Kulturüberständen des Stammes *S. aureus* Newman durch TCA-Präzipitation gewonnen. In vier Zellfusionen konnten im Anschluss daran monoklonale Antikörper gegen die SERAMs Coa, vWbp, Emp und Efb, sowie die Proteine IsaA und Glycerolesterhydrolase generiert und charakterisiert werden. Zwei mAks (α -Emp, α -Efb) waren neben ihrer Anwendung im *Immunoblot* auch zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion ihrer Antigene im 3D-CoG/FP geeignet. Die übrigen Antikörper zeigten nur im *Immunoblot* spezifische Reaktivität gegen ihre Antigene.

Geeignete mAks wurden sowohl im *Immunoblot* als auch im 3D-CoG/FP zur genaueren Analyse der Antigene hinsichtlich Sekretionsmenge und Lokalisation angewendet. Neben dem Referenzstamm *S. aureus* Newman wurden verschieden klinische MSSA- und MRSA-Isolate vergleichend analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das SERAM-Proteinmuster stammspezifisch ist, was auf stammspezifische Pathomechanismen hindeuten könnte.

Mit den in dieser Arbeit generierten Antikörpern standen zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit erstmals monoklonale Antikörper gegen verschiedene SERAMs von *S. aureus* Newman für infektionsbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

In aufgereinigter Form könnten die mAks auch für immunhistochemische Untersuchungen in Gewebeschnitten angewendet werden und so weitere Einblicke in pathogenetische Prinzipien der Entstehung und Entwicklung Staphylokokken-bedingter Erkrankungen bieten. Vor dem Hintergrund der zunehmender Resistenzen und der damit einhergehenden Einschränkung therapeutischer Möglichkeiten, wäre auch eine Evaluation hinsichtlich protektiver Eigenschaften der mAks eine interessante Perspektive. In diagnostischen Ansätzen könnten die monoklonalen Antikörper zum schnellen und spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Antigenen zur Anwendung kommen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, R. L. and R. J. Bird (2009). "Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants." Nephrology (Carlton) **14**(5): 462-470.
- Allen, R. C., R. Popat, S. P. Diggle and S. P. Brown (2014). "Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs?" Nat Rev Microbiol **12**(4): 300-308.
- Athanasopoulos, A. N., M. Economopoulou, V. V. Orlova, A. Sobke, D. Schneider, H. Weber, H. G. Augustin, S. A. Eming, U. Schubert, T. Linn, P. P. Nawroth, M. Hussain, H. P. Hammes, M. Herrmann, K. T. Preissner and T. Chavakis (2006). "The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms." Blood **107**(7): 2720-2727.
- Avery, O. T., C. M. Macleod and M. McCarty (1944). "STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III." J Exp Med **79**(2): 137-158.
- Balaban, N. and A. Rasooly (2000). "Staphylococcal enterotoxins." Int J Food Microbiol **61**(1): 1-10.
- Barber, M. (1961). "Methicillin-resistant staphylococci." J Clin Pathol **14**: 385-393.
- Barber, M. and M. Rozwadowska-Dowzenko (1948). "Infection by penicillin-resistant staphylococci." Lancet **2**(6530): 641-644.
- Bartlett, A. H. and K. G. Hulten (2010). "Staphylococcus aureus pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins." Pediatr Infect Dis J **29**(9): 860-861.
- Becker, K., C. Heilmann and G. Peters (2014). "Coagulase-negative staphylococci." Clin Microbiol Rev **27**(4): 870-926.
- Becker, R. E. and J. Bubeck Wardenburg (2015). "Staphylococcus aureus and the skin: a longstanding and complex interaction." Skinmed **13**(2): 111-119; quiz 120.
- Becker, S., M. B. Frankel, O. Schneewind and D. Missiakas (2014). "Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(4): 1574-1579.
- Behnsen, J., P. Narang, M. Hasenberg, F. Gunzer, U. Bilitewski, N. Klippel, M. Rohde, M. Brock, A. A. Brakhage and M. Gunzer (2007). "Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*." PLoS Pathog **3**(2): e13.
- Bennett, J. S., J. A. Hoxie, S. F. Leitman, G. Vailaire and D. B. Cines (1983). "Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(9): 2417-2421.

- Bera, A., S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer and F. Gotz (2005). "Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **55**(3): 778-787.
- Berlon, N. R., R. Qi, B. K. Sharma-Kuinkel, H. S. Joo, L. P. Park, D. George, J. T. Thaden, J. A. Messina, S. A. Maskarinec, M. Mueller-Premru, E. Athan, P. Tattevin, J. M. Pericas, C. W. Woods, M. Otto and V. G. Fowler, Jr. (2015). "Clinical MRSA isolates from skin and soft tissue infections show increased in vitro production of phenol soluble modulins." J Infect.
- Berube, B. J. and J. Bubeck Wardenburg (2013). "Staphylococcus aureus alpha-toxin: nearly a century of intrigue." Toxins (Basel) **5**(6): 1140-1166.
- Bjerketorp, J., K. Jacobsson and L. Frykberg (2004). "The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase." FEMS Microbiol Lett **234**(2): 309-314.
- Bjerketorp, J., M. Nilsson, A. Ljungh, J. I. Flock, K. Jacobsson and L. Frykberg (2002). "A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*." Microbiology **148**(Pt 7): 2037-2044.
- Blom, A. M., T. Hallstrom and K. Riesbeck (2009). "Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond." Mol Immunol **46**(14): 2808-2817.
- Blomback, B. and M. Blomback (1972). "The molecular structure of fibrinogen." Ann N Y Acad Sci **202**: 77-97.
- Boden, M. K. and J. I. Flock (1989). "Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*." Infect Immun **57**(8): 2358-2363.
- Boden, M. K. and J. I. Flock (1994). "Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **12**(4): 599-606.
- Boden Wastfelt, M. K. and J. I. Flock (1995). "Incidence of the highly conserved fib gene and expression of the fibrinogen-binding (Fib) protein among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*." J Clin Microbiol **33**(9): 2347-2352.
- Böllner, S. (2015). Charakterisierung von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA) Referenzstämmen hinsichtlich β -Laktam-Antibiotika Resistenz, Pathogenitätsfaktoren und Wachstum im Kollagengel Dissertation, Technische Universität München.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bundesregierung. (2016). "Schwerpunktthemen stehen fest." Retrieved 28.11.2016, 2016, from <https://www.g7germany.de/Webs/G7/DE/G7-Gipfel/G7->

Themen/themen_node.html;jsessionid=92842A58697A72ED95DD8124F7FFB47C.s4t2.

- Carragee, E. J. (1997). "Pyogenic vertebral osteomyelitis." *J Bone Joint Surg Am* **79**(6): 874-880.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in regulation of adaptive immunity." *Nat Immunol* **5**(10): 981-986.
- Cascioferro, S., D. Raffa, B. Maggio, M. V. Raimondi, D. Schillaci and G. Daidone (2015). "Sortase A Inhibitors: Recent Advances and Future Perspectives." *J Med Chem*.
- Chaibenjawong, P. and S. J. Foster (2011). "Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*." *Arch Microbiol* **193**(2): 125-135.
- Chapman, G. H., C. Berens, A. Peters and L. Curcio (1934). "Coagulase and Hemolysin Tests as Measures of the Pathogenicity of *Staphylococci*." *J Bacteriol* **28**(4): 343-363.
- Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann and K. T. Preissner (2002). "Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes." *Nat Med* **8**(7): 687-693.
- Chavakis, T., K. Wiechmann, K. T. Preissner and M. Herrmann (2005). "Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems." *Thromb Haemost* **94**(2): 278-285.
- Cheng, A. G., A. C. DeDent, O. Schneewind and D. Missiakas (2011). "A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation." *Trends Microbiol* **19**(5): 225-232.
- Cheng, A. G., H. K. Kim, M. L. Burts, T. Krausz, O. Schneewind and D. M. Missiakas (2009). "Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues." *Faseb j* **23**(10): 3393-3404.
- Cheng, A. G., M. McAdow, H. K. Kim, T. Bae, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2010). "Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001036.
- Cho, H. (2015). "Complement regulation: physiology and disease relevance." *Korean J Pediatr* **58**(7): 239-244.
- Cho, I., S. Yamanishi, L. Cox, B. A. Methe, J. Zavadil, K. Li, Z. Gao, D. Mahana, K. Raju, I. Teitler, H. Li, A. V. Alekseyenko and M. J. Blaser (2012). "Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity." *Nature* **488**(7413): 621-626.
- Chuard, C., P. E. Vaudaux, R. A. Proctor and D. P. Lew (1997). "Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces." *J Antimicrob Chemother* **39**(5): 603-608.

- Claes, J., T. Vanassche, M. Peetermans, L. Liesenborghs, C. Vandenbriele, K. Vanhoorelbeke, D. Missiakas, O. Schneewind, M. F. Hoylaerts, R. Heying and P. Verhamme (2014). "Adhesion of *Staphylococcus aureus* to the vessel wall under flow is mediated by von Willebrand factor-binding protein." Blood **124**(10): 1669-1676.
- Clatworthy, A. E., E. Pierson and D. T. Hung (2007). "Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy." Nat Chem Biol **3**(9): 541-548.
- Claus, F., A. Sachse and W. Ried (2014). "[On the economic burden of MRSA in Germany]." Gesundheitswesen **76**(12): 800-806.
- Colca, J. R., W. G. McDonald, D. J. Waldon, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, E. T. Lund, G. S. Cavey, W. R. Mathews, L. D. Adams, E. T. Cecil, J. D. Pearson, J. H. Bock, J. E. Mott, D. L. Shinabarger, L. Xiong and A. S. Mankin (2003). "Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics." J Biol Chem **278**(24): 21972-21979.
- Conlon, B. P. (2014). "Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease." Bioessays **36**(10): 991-996.
- Cooper, M. A. and D. Shlaes (2011). "Fix the antibiotics pipeline." Nature **472**(7341): 32.
- Corrigan, R. M., H. Miajlovic and T. J. Foster (2009). "Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells." BMC Microbiol **9**: 22.
- Cosgrove, S. E., G. Sakoulas, E. N. Perencevich, M. J. Schwaber, A. W. Karchmer and Y. Carmeli (2003). "Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis." Clin Infect Dis **36**(1): 53-59.
- Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci." Clin Infect Dis **42 Suppl 1**: S25-34.
- Cregg, K. M., I. Wilding and M. T. Black (1996). "Molecular cloning and expression of the *spsB* gene encoding an essential type I signal peptidase from *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **178**(19): 5712-5718.
- Cruz-Topete, D., T. Iwaki, V. A. Ploplis and F. J. Castellino (2006). "Delayed inflammatory responses to endotoxin in fibrinogen-deficient mice." J Pathol **210**(3): 325-333.
- Daum, R. S. and B. Spellberg (2012). "Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine." Clin Infect Dis **54**(4): 560-567.
- de Keyzer, J., C. van der Does and A. J. Driessen (2003). "The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex." Cell Mol Life Sci **60**(10): 2034-2052.
- Deivanayagam, C. C., E. R. Wann, W. Chen, M. Carson, K. R. Rajashankar, M. Hook and S. V. Narayana (2002). "A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of

LITERATURVERZEICHNIS

- Staphylococcus aureus: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A." Embo j **21**(24): 6660-6672.
- DeLeo, F. R., M. Otto, B. N. Kreiswirth and H. F. Chambers (2010). "Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus." Lancet **375**(9725): 1557-1568.
- DeVries, A. S., L. Leshner, P. M. Schlievert, T. Rogers, L. G. Villaume, R. Danila and R. Lynfield (2011). "Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics." PLoS One **6**(8): e22997.
- Di Giambattista, M., G. Chinali and C. Cocito (1989). "The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes." J Antimicrob Chemother **24**(4): 485-507.
- Doolittle, R. F. (1984). "Fibrinogen and fibrin." Annu Rev Biochem **53**: 195-229.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-6145.
- Drew, A. F., H. Liu, J. M. Davidson, C. C. Daugherty and J. L. Degen (2001). "Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen." Blood **97**(12): 3691-3698.
- Duthie, E. S. and L. L. Lorenz (1952). "Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity." J Gen Microbiol **6**(1-2): 95-107.
- Dyke, K. G., M. P. Jevons and M. T. Parker (1966). "Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in Staphylococcus aureus." Lancet **1**(7442): 835-838.
- Dziewanowska, K., A. R. Carson, J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles and G. A. Bohach (2000). "Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells." Infect Immun **68**(11): 6321-6328.
- El-Gilany, A. H. and H. Fathy (2009). "Risk factors of recurrent furunculosis." Dermatol Online J **15**(1): 16.
- Flick, M. J., X. Du, D. P. Witte, M. Jirouskova, D. A. Soloviev, S. J. Busuttill, E. F. Plow and J. L. Degen (2004). "Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo." J Clin Invest **113**(11): 1596-1606.
- Foster, T. J. (2005). "Immune evasion by staphylococci." Nat Rev Microbiol **3**(12): 948-958.
- Foster, T. J., J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh and M. Hook (2014). "Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus." Nat Rev Microbiol **12**(1): 49-62.
- Fowler, V. G., Jr., J. M. Miro, B. Hoen, C. H. Cabell, E. Abrutyn, E. Rubinstein, G. R. Corey, D. Spelman, S. F. Bradley, B. Barsic, P. A. Pappas, K. J. Anstrom, D. Wray, C. Q. Fortes, I. Anguera, E. Athan, P. Jones, J. T. van der Meer, T. S. Elliott, D. P. Levine and A. S.

- Bayer (2005). "Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress." *Jama* **293**(24): 3012-3021.
- Fowler, V. G., Jr. and R. A. Proctor (2014). "Where does a Staphylococcus aureus vaccine stand?" *Clin Microbiol Infect* **20 Suppl 5**: 66-75.
- Francis, J. S., M. C. Doherty, U. Lopatin, C. P. Johnston, G. Sinha, T. Ross, M. Cai, N. N. Hansel, T. Perl, J. R. Ticehurst, K. Carroll, D. L. Thomas, E. Nuermberger and J. G. Bartlett (2005). "Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton-Valentine leukocidin genes." *Clin Infect Dis* **40**(1): 100-107.
- Freund, S., B. Czech, K. Trulzsch, N. Ackermann and J. Heesemann (2008). "Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of Yersinia enterocolitica in three-dimensional collagen gels." *J Bacteriol* **190**(12): 4111-4120.
- Friedl, P. and E. B. Brouck (2000). "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix." *Cell Mol Life Sci* **57**(1): 41-64.
- Friedrich, R., P. Panizzi, P. Fuentes-Prior, K. Richter, I. Verhamme, P. J. Anderson, S. Kawabata, R. Huber, W. Bode and P. E. Bock (2003). "Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation." *Nature* **425**(6957): 535-539.
- Ganesh, V. K., E. M. Barbu, C. C. Deivanayagam, B. Le, A. S. Anderson, Y. V. Matsuka, S. L. Lin, T. J. Foster, S. V. Narayana and M. Hook (2011). "Structural and biochemical characterization of Staphylococcus aureus clumping factor B/ligand interactions." *J Biol Chem* **286**(29): 25963-25972.
- Ganesh, V. K., J. J. Rivera, E. Smeds, Y. P. Ko, M. G. Bowden, E. R. Wann, S. Gurusiddappa, J. R. Fitzgerald and M. Hook (2008). "A structural model of the Staphylococcus aureus ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000226.
- Ganga, R., K. Riederer, M. Sharma, M. G. Fakih, L. B. Johnson, S. Shemes and R. Khatib (2009). "Role of SCCmec type in outcome of Staphylococcus aureus bacteremia in a single medical center." *J Clin Microbiol* **47**(3): 590-595.
- Goding, J. W. (1978). "Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent." *J Immunol Methods* **20**: 241-253.
- Griffith, F. (1928). "The Significance of Pneumococcal Types." *J Hyg (Lond)* **27**(2): 113-159.
- Guggenberger, C., C. Wolz, J. A. Morrissey and J. Heesemann (2012). "Two distinct coagulase-dependent barriers protect Staphylococcus aureus from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model." *PLoS Pathog* **8**(1): e1002434.
- Guidry, A. J., K. E. Squiggins, W. F. Vann and D. C. Westhoff (1991). "Prevention of nonspecific binding of immunoglobulin to Staphylococcus aureus protein A in ELISA assays." *J Immunol Methods* **143**(2): 159-165.

LITERATURVERZEICHNIS

- Haggar, A., C. Ehrnfelt, J. Holgersson and J. I. Flock (2004). "The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells." *Infect Immun* **72**(10): 6164-6167.
- Haggar, A., M. Hussain, H. Lonnie, M. Herrmann, A. Norrby-Teglund and J. I. Flock (2003). "Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells." *Infect Immun* **71**(5): 2310-2317.
- Hair, P. S., C. G. Echague, A. M. Sholl, J. A. Watkins, J. A. Geoghegan, T. J. Foster and K. M. Cunnion (2010). "Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis." *Infect Immun* **78**(4): 1717-1727.
- Hair, P. S., M. D. Ward, O. J. Semmes, T. J. Foster and K. M. Cunnion (2008). "Staphylococcus aureus clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b." *J Infect Dis* **198**(1): 125-133.
- Hallstrom, T. and K. Riesbeck (2010). "Haemophilus influenzae and the complement system." *Trends Microbiol* **18**(6): 258-265.
- Hammel, M., G. Sfyroera, D. Ricklin, P. Magotti, J. D. Lambris and B. V. Geisbrecht (2007). "A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*." *Nat Immunol* **8**(4): 430-437.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hanakawa, Y., N. M. Schechter, C. Lin, L. Garza, H. Li, T. Yamaguchi, Y. Fudaba, K. Nishifuji, M. Sugai, M. Amagai and J. R. Stanley (2002). "Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome." *J Clin Invest* **110**(1): 53-60.
- Handler, M. Z. and R. A. Schwartz (2014). "Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults." *J Eur Acad Dermatol Venereol* **28**(11): 1418-1423.
- Harraghy, N., M. Hussain, A. Haggar, T. Chavakis, B. Sinha, M. Herrmann and J. I. Flock (2003). "The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap." *Microbiology* **149**(Pt 10): 2701-2707.
- Harraghy, N., J. Kormanec, C. Wolz, D. Homerova, C. Goerke, K. Ohlsen, S. Qazi, P. Hill and M. Herrmann (2005). "sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp." *Microbiology* **151**(Pt 6): 1789-1800.
- Hartman, B. J. and A. Tomasz (1984). "Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* **158**(2): 513-516.
- Heesemann, J., H. Kalthoff and F. Koch (1986). "Monoclonal antibodies directed against plasmid-encoded released proteins of enteropathogenic *Yersinia*." *FEMS Microbiology Letters* **36**(1): 15-19.

- Hendrix, H., T. Lindhout, K. Mertens, W. Engels and H. C. Hemker (1983). "Activation of human prothrombin by stoichiometric levels of staphylocoagulase." J Biol Chem **258**(6): 3637-3644.
- Herbert, S., A. K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schafer, M. Hecker, D. Albrecht, R. Novick and F. Gotz (2010). "Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates." Infect Immun **78**(6): 2877-2889.
- Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch and R. S. Daum (1998). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk." Jama **279**(8): 593-598.
- Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda and T. Ito (2001). "The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Trends Microbiol **9**(10): 486-493.
- Holmes, N. E., S. Y. Tong, J. S. Davis and S. J. Hal (2015). "Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and beyond." Semin Respir Crit Care Med **36**(1): 17-30.
- Howden, B. P., J. K. Davies, P. D. Johnson, T. P. Stinear and M. L. Grayson (2010). "Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications." Clin Microbiol Rev **23**(1): 99-139.
- Hussain, M., K. Becker, C. von Eiff, G. Peters and M. Herrmann (2001b). "Analogues of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates." Clin Diagn Lab Immunol **8**(6): 1271-1276.
- Hussain, M., K. Becker, C. von Eiff, J. Schrenzel, G. Peters and M. Herrmann (2001a). "Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins." J Bacteriol **183**(23): 6778-6786.
- Hussain, M., A. Haggar, C. Heilmann, G. Peters, J. I. Flock and M. Herrmann (2002). "Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts." Infect Immun **70**(6): 2933-2940.
- Hussain, M., A. Haggar, G. Peters, G. S. Chhatwal, M. Herrmann, J. I. Flock and B. Sinha (2008). "More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation." Infect Immun **76**(12): 5615-5623.
- Ilangoan, U., H. Ton-That, J. Iwahara, O. Schneewind and R. T. Clubb (2001). "Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6056-6061.

- Imamura, T., S. Tanase, G. Szmyd, A. Kozik, J. Travis and J. Potempa (2005). "Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*." J Exp Med **201**(10): 1669-1676.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipkind, A. Nordheim and H. G. Stunnenberg (1991). "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8972-8976.
- Jevitt, L. A., A. J. Smith, P. P. Williams, P. M. Raney, J. E. McGowan, Jr. and F. C. Tenover (2003). "In vitro activities of Daptomycin, Linezolid, and Quinupristin-Dalfopristin against a challenge panel of *Staphylococci* and *Enterococci*, including vancomycin-intermediate *staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." Microb Drug Resist **9**(4): 389-393.
- Joh, D., E. R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale and M. Hook (1999). "Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells." Matrix Biol **18**(3): 211-223.
- Johnson, M., A. Cockayne and J. A. Morrissey (2008). "Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp." Infect Immun **76**(4): 1756-1765.
- Jongerijs, I., J. Kohl, M. K. Pandey, M. Ruyken, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp and S. H. Rooijackers (2007). "Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules." J Exp Med **204**(10): 2461-2471.
- Jongerijs, I., M. von Kockritz-Blickwede, M. J. Horsburgh, M. Ruyken, V. Nizet and S. H. Rooijackers (2012). "Staphylococcus aureus virulence is enhanced by secreted factors that block innate immune defenses." J Innate Immun **4**(3): 301-311.
- Jonsson, K., D. McDevitt, M. H. McGavin, J. M. Patti and M. Hook (1995). "Staphylococcus aureus expresses a major histocompatibility complex class II analog." J Biol Chem **270**(37): 21457-21460.
- Kadariya, J., T. C. Smith and D. Thapaliya (2014). "Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health." Biomed Res Int **2014**: 827965.
- Kahl, B., M. Herrmann, A. S. Everding, H. G. Koch, K. Becker, E. Harms, R. A. Proctor and G. Peters (1998). "Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis." J Infect Dis **177**(4): 1023-1029.
- Kaneko, J. and Y. Kamio (2004). "Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes." Biosci Biotechnol Biochem **68**(5): 981-1003.
- Kang, M., Y. P. Ko, X. Liang, C. L. Ross, Q. Liu, B. E. Murray and M. Hook (2013). "Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway." J Biol Chem **288**(28): 20520-20531.

- Karlsson, A., P. Saravia-Otten, K. Tegmark, E. Morfeldt and S. Arvidson (2001). "Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases." Infect Immun **69**(8): 4742-4748.
- Katayama, Y., T. Ito and K. Hiramatsu (2000). "A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **44**(6): 1549-1555.
- Kawabata, S., T. Morita, S. Iwanaga and H. Igarashi (1985). "Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin." J Biochem **98**(6): 1603-1614.
- Keane, F. M., A. Loughman, V. Valtulina, M. Brennan, P. Speziale and T. J. Foster (2007). "Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **63**(3): 711-723.
- Kim, S.H., K. H. Kim, H. B. Kim, N. J. Kim, E. C. Kim, M. D. Oh and K. W. Choe (2008). "Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia." Antimicrob Agents Chemother **52**(1): 192-197.
- Kim, S. J., J. Chang, B. Rimal, H. Yang and J. Schaefer (2018). "Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*." Biochim Biophys Acta **1860**(3): 749-756.
- Kluytmans, J., A. van Belkum and H. Verbrugh (1997). "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks." Clin Microbiol Rev **10**(3): 505-520.
- Knecht, D. A. and R. L. Dimond (1984). "Visualization of antigenic proteins on Western blots." Anal Biochem **136**(1): 180-184.
- Ko, Y. P., A. Kuipers, C. M. Freitag, I. Jongerius, E. Medina, W. J. van Rooijen, A. N. Spaan, K. P. van Kessel, M. Hook and S. H. Rooijackers (2013). "Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface." PLoS Pathog **9**(12): e1003816.
- Ko, Y. P., X. Liang, C. W. Smith, J. L. Degen and M. Hook (2011). "Binding of Efb from *Staphylococcus aureus* to fibrinogen blocks neutrophil adherence." J Biol Chem **286**(11): 9865-9874.
- Koenen, M., U. Ruther and B. Muller-Hill (1982). "Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*." Embo j **1**(4): 509-512.
- Köhler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.
- Kolar, S. L., J. A. Ibarra, F. E. Rivera, J. M. Mootz, J. E. Davenport, S. M. Stevens, A. R. Horswill and L. N. Shaw (2013). "Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus*

- aureus virulence via the global modulation of virulence-determinant stability." Microbiologyopen **2**(1): 18-34.
- Korkmaz, B., M. S. Horwitz, D. E. Jenne and F. Gauthier (2010). "Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases." Pharmacol Rev **62**(4): 726-759.
- Kramer, A., I. Schwebke and G. Kampf (2006). "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review." BMC Infect Dis **6**: 130.
- Krurup, A., R. Wallis, J. S. Presanis, P. Gal and R. B. Sim (2007). "Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2." PLoS One **2**(7): e623.
- Kusch, H. and S. Engelmann (2014). "Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*." Int J Med Microbiol **304**(2): 133-141.
- Labandeira-Rey, M., F. Couzon, S. Boisset, E. L. Brown, M. Bes, Y. Benito, E. M. Barbu, V. Vazquez, M. Hook, J. Etienne, F. Vandenesch and M. G. Bowden (2007). "Staphylococcus aureus Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia." Science **315**(5815): 1130-1133.
- Ladhani, S. (2003). "Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*." FEMS Immunol Med Microbiol **39**(2): 181-189.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambris, J. D., D. Ricklin and B. V. Geisbrecht (2008). "Complement evasion by human pathogens." Nat Rev Microbiol **6**(2): 132-142.
- Lammermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler and M. Sixt (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-55.
- Leach, K. L., S. M. Swaney, J. R. Colca, W. G. McDonald, J. R. Blinn, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong and A. S. Mankin (2007). "The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria." Mol Cell **26**(3): 393-402.
- Lee, L. Y., M. Hook, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio and E. L. Brown (2004a). "Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein." J Infect Dis **190**(3): 571-579.
- Lee, L. Y., X. Liang, M. Hook and E. L. Brown (2004b). "Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb)." J Biol Chem **279**(49): 50710-50716.
- Lehman, I. R. (1974). "DNA ligase: structure, mechanism, and function." Science **186**(4166): 790-797.

- Levi, M., T. T. Keller, E. van Gorp and H. ten Cate (2003). "Infection and inflammation and the coagulation system." Cardiovasc Res **60**(1): 26-39.
- Lindahl, G., U. Sjöbring and E. Johnsson (2000). "Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms." Curr Opin Immunol **12**(1): 44-51.
- Loeb, L. (1903). "The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood." J Med Res **10**(3): 407-419.
- Loof, T. G., M. Morgelin, L. Johansson, S. Oehmcke, A. I. Olin, G. Dickneite, A. Norrby-Teglund, U. Theopold and H. Herwald (2011). "Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense." Blood **118**(9): 2589-2598.
- Lorenz, U., B. Lorenz, T. Schmitter, K. Streker, C. Erck, J. Wehland, J. Nickel, B. Zimmermann and K. Ohlsen (2011). "Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 165-173.
- Lowy, F. D. (1998). "Staphylococcus aureus infections." N Engl J Med **339**(8): 520-532.
- Mainiero, M., C. Goerke, T. Geiger, C. Gonser, S. Herbert and C. Wolz (2010). "Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS." J Bacteriol **192**(3): 613-623.
- Mamo, W., M. Boden and J. I. Flock (1994). "Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model." FEMS Immunol Med Microbiol **10**(1): 47-53.
- Marraffini, L. A., A. C. Dedent and O. Schneewind (2006). "Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **70**(1): 192-221.
- Masschalck, B. and C. W. Michiels (2003). "Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria." Crit Rev Microbiol **29**(3): 191-214.
- Massimi, I., E. Park, K. Rice, W. Müller-Esterl, D. Sauder and M. J. McGavin (2002). "Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **277**(44): 41770-41777.
- Matsushashi, M., M. D. Song, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, K. Ubukata, N. Yamashita and M. Konno (1986). "Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **167**(3): 975-980.
- Mazmanian, S. K., G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy and O. Schneewind (2000). "Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5510-5515.

- McAdow, M., H. K. Kim, A. C. Dedent, A. P. Hendrickx, O. Schneewind and D. M. Missiakas (2011). "Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002307.
- McAleese, F. M., E. J. Walsh, M. Sieprawska, J. Potempa and T. J. Foster (2001). "Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease." *J Biol Chem* **276**(32): 29969-29978.
- McDevitt, D., P. Vaudaux and T. J. Foster (1992). "Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor." *Infect Immun* **60**(4): 1514-1523.
- McGadey, J. (1970). "A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase." *Histochemie* **23**(2): 180-184.
- McGavin, M. J., C. Zahradka, K. Rice and J. E. Scott (1997). "Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease." *Infect Immun* **65**(7): 2621-2628.
- Mehlin, C., C. M. Headley and S. J. Klebanoff (1999). "An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization." *J Exp Med* **189**(6): 907-918.
- Missiakas, D. and O. Schneewind (2016). "Staphylococcus aureus vaccines: Deviating from the carol." *J Exp Med* **213**(9): 1645-1653.
- Movitz, J. (1976). "Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*." *Eur J Biochem* **68**(1): 291-299.
- Mulcahy, M. E., J. A. Geoghegan, I. R. Monk, K. M. O'Keeffe, E. J. Walsh, T. J. Foster and R. M. McLoughlin (2012). "Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin." *PLoS Pathog* **8**(12): e1003092.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Murray, R. J. (2005). "Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease." *Intern Med J* **35 Suppl 2**: S106-119.
- Naimi, T. S., K. H. LeDell, K. Como-Sabetti, S. M. Borchardt, D. J. Boxrud, J. Etienne, S. K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O'Boyle, R. N. Danila and R. Lynfield (2003). "Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." *Jama* **290**(22): 2976-2984.
- Nanra, J. S., S. M. Buitrago, S. Crawford, J. Ng, P. S. Fink, J. Hawkins, I. L. Scully, L. K. McNeil, J. M. Aste-Amezaga, D. Cooper, K. U. Jansen and A. S. Anderson (2013). "Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*." *Hum Vaccin Immunother* **9**(3): 480-487.

- Neely, A. N. and M. P. Maley (2000). "Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic." J Clin Microbiol **38**(2): 724-726.
- Neth, O., D. L. Jack, M. Johnson, N. J. Klein and M. W. Turner (2002). "Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*." J Immunol **169**(8): 4430-4436.
- Nguyen, H. M., M. A. Rocha, K. R. Chintalacharuvu and D. O. Beenhouwer (2010). "Detection and quantification of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* cultures by ELISA and Western blotting: diethylpyrocarbonate inhibits binding of protein A to IgG." J Immunol Methods **356**(1-2): 1-5.
- Niebuhr, K. and F. Ebel (2003). "Generation of monoclonal antibodies against secreted proteins of STEC." Methods Mol Med **73**: 125-135.
- O'Brien, F. G., T. T. Lim, F. N. Chong, G. W. Coombs, M. C. Enright, D. A. Robinson, A. Monk, B. Said-Salim, B. N. Kreiswirth and W. B. Grubb (2004). "Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia." J Clin Microbiol **42**(7): 3185-3190.
- O'Halloran, D. P., K. Wynne and J. A. Geoghegan (2015). "Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal." Infect Immun **83**(4): 1598-1609.
- O'Riordan, K. and J. C. Lee (2004). "Staphylococcus aureus capsular polysaccharides." Clin Microbiol Rev **17**(1): 218-234.
- Oesterreich, B., B. Lorenz, T. Schmitter, R. Kontermann, M. Zenn, B. Zimmermann, M. Haake, U. Lorenz and K. Ohlsen (2014). "Characterization of the biological anti-staphylococcal functionality of hUK-66 IgG1, a humanized monoclonal antibody as substantial component for an immunotherapeutic approach." Hum Vaccin Immunother **10**(4): 926-937.
- Ogston, A. (1881). "Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases." Br Med J **1**(1054): 369.362-375.
- Ohsawa, H., T. Baba, J. Enami and K. Hiramatsu (2015). "Successful selection of an infection-protective anti-*Staphylococcus aureus* monoclonal antibody and its protective activity in murine infection models." Microbiol Immunol **59**(4): 183-192.
- Otto, M. (2010). "Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Annu Rev Microbiol **64**: 143-162.
- Otto, M. (2014). "Staphylococcus aureus toxins." Curr Opin Microbiol **17**: 32-37.
- Palma, M., A. Hagggar and J. I. Flock (1999). "Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity." J Bacteriol **181**(9): 2840-2845.

LITERATURVERZEICHNIS

- Palma, M., S. Nozohoor, T. Schennings, A. Heimdahl and J. I. Flock (1996). "Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection." Infect Immun **64**(12): 5284-5289.
- Palma, M., O. Shannon, H. C. Quezada, A. Berg and J. I. Flock (2001). "Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain." J Biol Chem **276**(34): 31691-31697.
- Palma, M., D. Wade, M. Flock and J. I. Flock (1998). "Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen." J Biol Chem **273**(21): 13177-13181.
- Pambakian, S. and R. N. Poston (1987). "The binding of immunoglobulin Fc to cationic proteins." Clin Exp Immunol **68**(2): 402-408.
- Paniker, A. A., R. Ananthanarayan and C. K. J. Paniker (2005). Ananthanarayan and Paniker's Textbook of Microbiology, Orient Longman.
- Panizzi, P., R. Friedrich, P. Fuentes-Prior, W. Bode and P. E. Bock (2004). "The staphylocoagulase family of zymogen activator and adhesion proteins." Cell Mol Life Sci **61**(22): 2793-2798.
- Panizzi, P., M. Nahrendorf, J. L. Figueiredo, J. Panizzi, B. Marinelli, Y. Iwamoto, E. Keliher, A. A. Maddur, P. Waterman, H. K. Kroh, F. Leuschner, E. Aikawa, F. K. Swirski, M. J. Pittet, T. M. Hackeng, P. Fuentes-Prior, O. Schneewind, P. E. Bock and R. Weissleder (2011). "In vivo detection of *Staphylococcus aureus* endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation." Nat Med **17**(9): 1142-1146.
- Park, B. and G. Y. Liu (2012). "Targeting the host-pathogen interface for treatment of *Staphylococcus aureus* infection." Semin Immunopathol **34**(2): 299-315.
- Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin and M. Hook (1994). "MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues." Annu Rev Microbiol **48**: 585-617.
- Paul, W. E. (2003). Fundamental immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Peacock, S. J. and G. K. Paterson (2015). "Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*." Annu Rev Biochem **84**: 577-601.
- Perl, T. M., J. J. Cullen, R. P. Wenzel, M. B. Zimmerman, M. A. Pfaller, D. Sheppard, J. Twombly, P. P. French and L. A. Herwaldt (2002). "Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections." N Engl J Med **346**(24): 1871-1877.
- Peters, J. H. and R. K. H. Gieseler (1990). Selektionsprinzipien. Monoklonale Antikörper Herstellung und Charakterisierung. J. H. Peters and H. Baumgarten, Springer Verlag: 139 - 149.
- Pilka, E. S., J. M. Werner, U. Schwarz-Linek, A. R. Pickford, N. A. Meenan, I. D. Campbell and J. R. Potts (2006). "Structural insight into binding of *Staphylococcus aureus* to human fibronectin." FEBS Lett **580**(1): 273-277.

LITERATURVERZEICHNIS

- Potempa, J., W. Watorek and J. Travis (1986). "The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **261**(30): 14330-14334.
- Proctor, R. A. (2012). "Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine." Clin Infect Dis **54**(8): 1179-1186.
- Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow and R. D. Arbeit (1995). "Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*." Clin Infect Dis **20**(1): 95-102.
- Reynolds, P. E. (1989). "Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8**(11): 943-950.
- Ricklin, D., S. K. Ricklin-Lichtsteiner, M. M. Markiewski, B. V. Geisbrecht and J. D. Lambris (2008). "Cutting edge: members of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein family inhibit the interaction of C3d with complement receptor 2." J Immunol **181**(11): 7463-7467.
- RKI (2009). Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA - RKI-Ratgeber für Ärzte, Robert Koch-Institut.
- RKI (2013). Epidemiologisches Bulletin 21 / 2013, Robert Koch-Institut.
- RKI (2014). Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen, Infektionskrankheiten / Erreger.
- RKI. (2015). "Antibiotika Resistenz Surveillance: Resistenzentwicklung." Retrieved 21.10.2015, 2015, from <https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceDevelopment.aspx>.
- RKI (2015). Epidemiologisches Bulletin 31 / 2015, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- Roberts, R. J., M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, J. Bitinaite, R. M. Blumenthal, S. Degtyarev, D. T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E. S. Gromova, R. I. Gumport, S. E. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D. P. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T. R. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D. H. Kruger, S. Lacks, M. G. Marinus, M. Miyahara, R. D. Morgan, N. E. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarowicz, A. Pingoud, E. Raleigh, D. N. Rao, N. Reich, V. E. Repin, E. U. Selker, P. C. Shaw, D. C. Stein, B. L. Stoddard, W. Szybalski, T. A. Trautner, J. L. Van Etten, J. M. Vitor, G. G. Wilson and S. Y. Xu (2003). "A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes." Nucleic Acids Res **31**(7): 1805-1812.
- Roghmann, M. C. (2000). "Predicting methicillin resistance and the effect of inadequate empiric therapy on survival in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia." Arch Intern Med **160**(7): 1001-1004.

LITERATURVERZEICHNIS

- Rolinson, G. N. (1961). "Celbenin" - resistant *Staphylococci*, Br Med J. 1961 Jan 14;1(5219):125-6.
- Rooijackers, S. H., K. P. van Kessel and J. A. van Strijp (2005). "Staphylococcal innate immune evasion." *Trends Microbiol* **13**(12): 596-601.
- Rozgonyi, F., E. Kocsis, K. Kristof and K. Nagy (2007). "Is MRSA more virulent than MSSA?" *Clin Microbiol Infect* **13**(9): 843-845.
- Rubinstein, E., M. H. Kollef and D. Nathwani (2008). "Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**: S378-385.
- Ruer, S., N. Pinotsis, D. Steadman, G. Waksman and H. Remaut (2015). "Virulence-targeted Antibacterials: Concept, Promise, and Susceptibility to Resistance Mechanisms." *Chem Biol Drug Des* **86**(4): 379-399.
- Sadler, J. E. (1998). "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." *Annu Rev Biochem* **67**: 395-424.
- Said-Salim, B., B. Mathema, K. Braughton, S. Davis, D. Sinsimer, W. Eisner, Y. Likhoshvay, F. R. Deleo and B. N. Kreiswirth (2005). "Differential distribution and expression of Pantone-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *J Clin Microbiol* **43**(7): 3373-3379.
- Salgado-Pabon, W. and P. M. Schlievert (2014). "Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine." *Nat Rev Microbiol* **12**(8): 585-591.
- Salinovich, O. and R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* **156**(2): 341-347.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sarma, J. V. and P. A. Ward (2011). "The complement system." *Cell Tissue Res* **343**(1): 227-235.
- Sarvas, M., C. R. Harwood, S. Bron and J. M. van Dijk (2004). "Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 311-327.
- Schafer, D., T. T. Lam, T. Geiger, M. Mainiero, S. Engelmann, M. Hussain, A. Bosserhoff, M. Frosch, M. Bischoff, C. Wolz, J. Reidl and B. Sinha (2009). "A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the response to biocide exposure." *J Bacteriol* **191**(23): 7306-7314.
- Schennings, T., F. Farnebo, L. Szekely and J. I. Flock (2012). "Protective immunization against *Staphylococcus aureus* infection in a novel experimental wound model in mice." *Apmis* **120**(10): 786-793.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schneewind, O. and D. M. Missiakas (2012). "Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1592): 1123-1139.
- Scully, I. L., P. A. Liberator, K. U. Jansen and A. S. Anderson (2014). "Covering all the Bases: Preclinical Development of an Effective Staphylococcus aureus Vaccine." Front Immunol **5**: 109.
- Sendi, P. and R. A. Proctor (2009). "Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants." Trends Microbiol **17**(2): 54-58.
- Sharp, J. A., C. G. Echague, P. S. Hair, M. D. Ward, J. O. Nyalwidhe, J. A. Geoghegan, T. J. Foster and K. M. Cunnion (2012). "Staphylococcus aureus surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic." PLoS One **7**(5): e38407.
- Shaw, L., E. Golonka, J. Potempa and S. J. Foster (2004). "The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus." Microbiology **150**(Pt 1): 217-228.
- Shuman, S. (1991). "Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10104-10108.
- Sibbald, M. J., A. K. Ziebandt, S. Engelmann, M. Hecker, A. de Jong, H. J. Harmsen, G. C. Raangs, I. Stokroos, J. P. Arends, J. Y. Dubois and J. M. van Dijk (2006). "Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics." Microbiol Mol Biol Rev **70**(3): 755-788.
- Silhavy, T. J., D. Kahne and S. Walker (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000414.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann and K. H. Krause (1999). "Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1." Cell Microbiol **1**(2): 101-117.
- Skurnik, D., A. Kropec, D. Roux, C. Theilacker, J. Huebner and G. B. Pier (2012). "Natural antibodies in normal human serum inhibit Staphylococcus aureus capsular polysaccharide vaccine efficacy." Clin Infect Dis **55**(9): 1188-1197.
- Spellberg, B. and R. Daum (2012). "Development of a vaccine against Staphylococcus aureus." Semin Immunopathol **34**(2): 335-348.
- Stapels, D. A., K. X. Ramyar, M. Bischoff, M. von Kockritz-Blickwede, F. J. Milder, M. Ruyken, J. Eisenbeis, W. J. McWhorter, M. Herrmann, K. P. van Kessel, B. V. Geisbrecht and S. H. Rooijakkers (2014). "Staphylococcus aureus secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(36): 13187-13192.
- Steenbergen, J. N., J. Alder, G. M. Thorne and F. P. Tally (2005). "Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections." J Antimicrob Chemother **55**(3): 283-288.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.

LITERATURVERZEICHNIS

- Stutzmann Meier, P., J. M. Entenza, P. Vaudaux, P. Francioli, M. P. Glauser and P. Moreillon (2001). "Study of Staphylococcus aureus pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism Streptococcus gordonii." Infect Immun **69**(2): 657-664.
- Thammavongsa, V., S. Rauch, H. K. Kim, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2015). "Protein A-neutralizing monoclonal antibody protects neonatal mice against Staphylococcus aureus." Vaccine **33**(4): 523-526.
- Thomer, L., C. Emolo, V. Thammavongsa, H. K. Kim, M. E. McAdow, W. Yu, M. Kieffer, O. Schneewind and D. Missiakas (2016). "Antibodies against a secreted product of Staphylococcus aureus trigger phagocytic killing." J Exp Med **213**(3): 293-301.
- Thomer, L., O. Schneewind and D. Missiakas (2013). "Multiple ligands of von Willebrand factor-binding protein (vWbp) promote Staphylococcus aureus clot formation in human plasma." J Biol Chem **288**(39): 28283-28292.
- Tjalsma, H., H. Antelmann, J. D. Jongbloed, P. G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, J. Y. Dubois, H. Westers, G. Zanen, W. J. Quax, O. P. Kuipers, S. Bron, M. Hecker and J. M. van Dijk (2004). "Proteomics of protein secretion by Bacillus subtilis: separating the "secrets" of the secretome." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 207-233.
- Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull and O. Schneewind (1999). "Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of Staphylococcus aureus at the LPXTG motif." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12424-12429.
- Tong, S. Y., J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland and V. G. Fowler, Jr. (2015). "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management." Clin Microbiol Rev **28**(3): 603-661.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Tsoukas, C. D. and J. D. Lambris (1993). "Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance." Immunol Today **14**(2): 56-59.
- Tuchscher, L., V. Heitmann, M. Hussain, D. Viemann, J. Roth, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker and B. Löffler (2010). "Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence." J Infect Dis **202**(7): 1031-1040.
- Tzianabos, A. O., J. Y. Wang and J. C. Lee (2001). "Structural rationale for the modulation of abscess formation by Staphylococcus aureus capsular polysaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9365-9370.
- Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. Matsushashi and M. Konno (1989). "Expression and inducibility in Staphylococcus aureus of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant S. aureus-specific penicillin-binding protein." J Bacteriol **171**(5): 2882-2885.

LITERATURVERZEICHNIS

- Udo, E. E., J. W. Pearman and W. B. Grubb (1993). "Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia." *J Hosp Infect* **25**(2): 97-108.
- Valeva, A., I. Walev, M. Pinkernell, B. Walker, H. Bayley, M. Palmer and S. Bhakdi (1997). "Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11607-11611.
- van Belkum, A., N. J. Verkaik, C. P. de Vogel, H. A. Boelens, J. Verveer, J. L. Nouwen, H. A. Verbrugh and H. F. Wertheim (2009). "Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types." *J Infect Dis* **199**(12): 1820-1826.
- van den Berg, S., H. P. Bonarius, K. P. van Kessel, G. S. Elsinga, N. Kooi, H. Westra, T. Bosma, M. M. van der Kooi-Pol, D. G. Koedijk, H. Groen, J. M. van Dijk, G. Buist and I. A. Bakker-Woudenberg (2015). "A human monoclonal antibody targeting the conserved staphylococcal antigen IsaA protects mice against *Staphylococcus aureus* bacteremia." *Int J Med Microbiol* **305**(1): 55-64.
- van der Poll, T. and H. Herwald (2014). "The coagulation system and its function in early immune defense." *Thromb Haemost* **112**(4): 640-648.
- van Hal, S. J., S. O. Jensen, V. L. Vaska, B. A. Espedido, D. L. Paterson and I. B. Gosbell (2012). "Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia." *Clin Microbiol Rev* **25**(2): 362-386.
- Vaudaux, P., P. Francois, C. Bisognano, W. L. Kelley, D. P. Lew, J. Schrenzel, R. A. Proctor, P. J. McNamara, G. Peters and C. Von Eiff (2002). "Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes." *Infect Immun* **70**(10): 5428-5437.
- Vollmer, W., D. Blanot and M. A. de Pedro (2008). "Peptidoglycan structure and architecture." *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 149-167.
- von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer and G. Peters (2001). "Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group." *N Engl J Med* **344**(1): 11-16.
- Voyich, J. M., M. Otto, B. Mathema, K. R. Braughton, A. R. Whitney, D. Welty, R. D. Long, D. W. Dorward, D. J. Gardner, G. Lina, B. N. Kreiswirth and F. R. DeLeo (2006). "Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease?" *J Infect Dis* **194**(12): 1761-1770.
- Wade, D., M. Palma, I. Lofving-Arvholm, M. Sallberg, J. Silberring and J. I. Flock (1998). "Identification of functional domains in Efb, a fibrinogen binding protein of *Staphylococcus aureus*." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 690-695.
- Walsh, E. J., H. Miajlovic, O. V. Gorkun and T. J. Foster (2008). "Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the alphaC-domain of human fibrinogen." *Microbiology* **154**(Pt 2): 550-558.

- Wang, R., K. R. Braughton, D. Kretschmer, T. H. Bach, S. Y. Queck, M. Li, A. D. Kennedy, D. W. Dorward, S. J. Klebanoff, A. Peschel, F. R. DeLeo and M. Otto (2007). "Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA." Nat Med **13**(12): 1510-1514.
- Watanabe, S., T. Ito, T. Sasaki, S. Li, I. Uchiyama, K. Kishii, K. Kikuchi, R. L. Skov and K. Hiramatsu (2009). "Genetic diversity of staphylocoagulase genes (coa): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*." PLoS One **4**(5): e5714.
- Watanabe, S., T. Ito, F. Takeuchi, M. Endo, E. Okuno and K. Hiramatsu (2005). "Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **187**(11): 3698-3707.
- Weber, K. and M. Osborn (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." J Biol Chem **244**(16): 4406-4412.
- Wenzel, R. P. and T. M. Perl (1995). "The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection." J Hosp Infect **31**(1): 13-24.
- Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh and J. L. Nouwen (2005). "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections." Lancet Infect Dis **5**(12): 751-762.
- Wilgus, T. A., S. Roy and J. C. McDaniel (2013). "Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(7): 379-388.
- Williams, R. E., M. P. Jevons, R. A. Shooter, C. J. Hunter, J. A. Girling, J. D. Griffiths and G. W. Taylor (1959). "Nasal staphylococci and sepsis in hospital patients." Br Med J **2**(5153): 658-662.
- Woehl, J. L., D. A. Stapels, B. L. Garcia, K. X. Ramyar, A. Keightley, M. Ruyken, M. Syriga, G. Sfyroera, A. B. Weber, M. Zolkiewski, D. Ricklin, J. D. Lambris, S. H. Rooijackers and B. V. Geisbrecht (2014). "The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase." J Immunol **193**(12): 6161-6171.
- Yaw, L. K., J. O. Robinson and K. M. Ho (2014). "A comparison of long-term outcomes after methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia: an observational cohort study." Lancet Infect Dis **14**(10): 967-975.
- Zecconi, A. and F. Scali (2013). "Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases." Immunol Lett **150**(1-2): 12-22.
- Zhang, J., H. Liu, K. Zhu, S. Gong, S. Dramsi, Y. T. Wang, J. Li, F. Chen, R. Zhang, L. Zhou, L. Lan, H. Jiang, O. Schneewind, C. Luo and C. G. Yang (2014). "Antiinfective therapy with a small molecule inhibitor of *Staphylococcus aureus* sortase." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(37): 13517-13522.

LITERATURVERZEICHNIS

- Zhang, L., K. Jacobsson, J. Vasi, M. Lindberg and L. Frykberg (1998). "A second IgG-binding protein in Staphylococcus aureus." Microbiology **144** (Pt 4): 985-991.
- Zong, Y., Y. Xu, X. Liang, D. R. Keene, A. Hook, S. Gurusiddappa, M. Hook and S. V. Narayana (2005). "A 'Collagen Hug' model for Staphylococcus aureus CNA binding to collagen." Embo j **24**(24): 4224-4236.

7 Anhang

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann bedanken, der mir die Durchführung dieses spannenden Projektes am Max von Pettenkofer-Institut ermöglichte und mir im Verlauf mit Rat und Tat zur Seite stand, stets ein offenes Ohr hatte, mich fachlich und menschlich bestens unterstützt und immer wieder ermutigt hat.

Großer Dank gilt Dr. Christoph Guggenberger, der mich großartig in die Welt des experimentell-wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt hat und mich besonders in der Anfangsphase der Doktorarbeit durch seine umfassende Betreuung unterstützt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Professor Dr. Frank Ebel, der mich in der Phase der Immunisierung und Generierung der monoklonalen Antikörper fachlich bestens begleitet hat und mir stets hilfsbereit zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei Bettina Sedlmeier-Erlenfeld für die zahlreichen Tipps im Laboralltag und die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Verlauf des Projektes.

Nicht zuletzt konnte das Projekt in dieser Weise nur wachsen und gelingen, weil ich es in einem sehr kollegialen und angenehmen Umfeld durchführen durfte. Deshalb möchte ich mich bei den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen aus dem Max von Pettenkofer-Institut bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich mich zu jeder Zeit gut aufgehoben gefühlt habe und die Zeit in guter Erinnerung behalten werde.

Ohne den Rückhalt meiner Eltern und meiner beiden Schwestern und meiner Freunde wäre die Doktorarbeit nicht in dieser Weise gelungen. Vielen Dank für eure stete Unterstützung, Geduld und Ermutigung.

Eidesstattliche Versicherung

Veit, Tobias Josef

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Herstellung und immunfluoreszenzmikroskopische Anwendung monoklonaler
Maus-Antikörper gegen sezernierte Proteine von *Staphylococcus aureus* (SERAMs)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 23.10.2019

Tobias Veit